

SÉRIE U.
N° D'ORDRE : 104.

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

René TIXIER

**Contribution à l'étude de quelques pigments pyrroliques naturels des
coquilles de Mollusques, de l'œuf d'Émeu et du squelette du Corail
bleu (*Heliopora cærulea*).**

Soutenue le 16 mai 1945, devant la Commission d'examen.

MM. FLEURY, *Président.*
VALETTE, }
GUILLOT, } *Examineurs.*

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VI^e)

1945

SÉRIE U.
N° D'ORDRE : 104.

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

René TIXIER

Contribution à l'étude de quelques pigments pyrroliques naturels des
coquilles de Mollusques, de l'œuf d'Emeu et du squelette du Corail
bleu (*Heliopora cærulea*).

Soutenue le 16 mai 1945, devant la Commission d'examen.

MM. FLEURY, *Président.*
VALETTE, }
GUILLOT, } *Examineurs.*

MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VI^e)

1945

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. DAMIENS, Doyen, O. ✱, ☼ I.
SOMMELET, Assesseur, ✱, ☼ I.
H.-J. LIONNET, Secrétaire, ☼ I.

PROFESSEURS

MM. DAMIENS, O. ✱, ☼ I.	Chimie minérale.
SOMMELET, ✱, ☼ I.	Chimie organique.
FABRE, ✱, ☼ I.	Toxicologie.
DELABY, ✱, ☼ I.	Pharmacie chimique.
PICON, ✱, ☼ I.	Physique.
MASCRÉ, ✱, ☼ I.	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
BACH, ✱, ☼ I.	Botanique générale.
FLEURY, ☼ I.	Chimie biologique.
RÉGNIER, ☼ I.	Microbiologie.
JANOT, ☼ A.	Pharmacie galénique.
CHARONNAT, ☼ I.	Chimie analytique.
VALETTE, ☼ A.	Zoologie appliquée.
BEDEL, ✱, ☼ I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. ✱, ☼ I. ; GUÉRIN, O. ✱, ☼ I.

Professeurs honoraires :

MM. DELÉPINE, O. ✱, ☼ I., et LEBEAU, O. ✱, ☼ I., membres de l'Institut.
PERROT, C. ✱, ☼ I. ; COUTIÈRE, O. ✱, ☼ I.
BOUGAULT, O. ✱, ☼ I. ; LUTZ, ✱, ☼ I.
GORIS, O. ✱, ☼ I. ; HÉRISSEY, O. ✱, ☼ I.
LAUNOY, O. ✱, ☼ I.

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM. GUILLOT	Sciences physiques et chimiques.
PARIS	Sciences naturelles.
GAUTIER, ☼ A.	Sciences physiques et chimiques.
RAOUL	Sciences naturelles.
DAVID, ☼ I.	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE, ☼ A.	Travaux pratiques de 1 ^{re} année : Chimie générale et pharmaceutique.
N	Travaux pratiques 2 ^e et 3 ^e années : Chimie analytique.
CORRIEZ, ☼ A.	Physique.
CRÉTÉ	Micrographie.
N	Microbiologie.
COURTOIS	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, ☼ A.

Bibliothécaire : M^{lle} LAVAUD, ☼ A.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 28 avril 1945.

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

A. DAMIENS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

G. ROUSSY.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE QUELQUES
PIGMENTS PYRROLIQUES NATURELS
DES COQUILLES DE MOLLUSQUES, DE L'ŒUF D'ÉMEU
ET DU SQUELETTE DU CORAIL BLEU
(*HELIOPORA CÆRULEA*)

PAR

RENÉ TIXIER

Assistant au Muséum national d'Histoire naturelle.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	344
-------------------	-----

PREMIÈRE PARTIE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PIGMENTS DES COQUILLES DES MOLLUSQUES

A. — HISTORIQUE.....	346
B. — RECHERCHES PERSONNELLES.....	352
I. Porphyrine des coquilles de <i>Pteria (Avicula) macroptera</i> LMK.....	352
A. Préparation (p. 353) : 1° décalcification et estérification (p. 353); 2° purification du pigment par chromatographie (p. 353). — B. Propriétés (p. 354) : spectre dans l'ultra-violet (p. 355); spectre dans le visible (p. 355); sel complexe de cuivre (p. 357). — C. Conclusion (p. 358).	
II. Porphyrine des coquilles de <i>Pteria margaritifera</i> L.....	358
A. Préparation (p. 358). — B. Propriétés (p. 359). — C. Conclusion (p. 359).	
III. Porphyrine des coquilles de <i>Clanculus pharaonis</i> L.....	359
A. Préparation (p. 359). — B. Propriétés (p. 359). — C. Conclusion (p. 360).	
IV. Porphyrines des coquilles de <i>Trochus virgatus</i> GMELIN et de <i>T. maculatus</i> L.....	360
A. Préparation (p. 360). — B. Propriétés (p. 360). — C. Conclusion (p. 360).	

DEUXIÈME PARTIE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU PIGMENT BLEU D'UN OCTOCORALLIAIRE (*HELIOPORA CÆRULEA* PALL.),
DE LA BILIVERDINE IX α ET DU PIGMENT DES COQUILLES D'ŒUFS D'ÉMEU
(*DROMICEIUS NOVÆ HOLLANDIÆ* [LATHAM])

A. — HISTORIQUE.....	361
I. Pigments biliaires à l'état de chromoprotéides.....	362
a. Phycchromoprotéides (p. 362). — b. Chromoprotéides des sécrétions des Aplysies (p. 363). — c. Ichtyochromoprotéides (p. 363). — d. Chromoprotéides des ailes de Papillons (p. 364).	
II. Pigments biliaires liés à des formations calcaires.....	364
a. Biliverdine des coquilles d'œufs d'Oiseaux (p. 364). — b. Pigments biliaires des coquilles de Mollusques (p. 365).	
B. — ESTER MÉTHYLIQUE DE LA BILIVERDINE IX α	365
a. Préparation (p. 367) : 1° oxydation de la bilirubine IX α (p. 367); 2° estérification (p. 368); 3° chromatographie (p. 368). — b. Propriétés (p. 369) : spectre d'absorption dans l'ultra-violet (p. 369); spectre d'absorption dans le visible (p. 372). — c. Conclusion (p. 374).	
C. — ESTER MÉTHYLIQUE DE LA BILIVERDINE DES COQUILLES D'ŒUFS D'ÉMEU (<i>Dromiceius Novæ Hollandiæ</i> [LATHAM]).....	374
a. Préparation (p. 375) : 1° décalcification et estérification (p. 375); 2° purification du pigment par chromatographie (p. 375). — b. Propriétés (p. 376) : réaction de Gmelin (p. 377); chromatographie mixte (p. 377); spectre d'absorption dans l'ultra-violet (p. 377); spectres d'absorption dans le visible (p. 378). — c. Conclusion (p. 379).	
D. — PIGMENT BLEU DU SQUELETTE CALCAIRE D'UN OCTOCORALLIAIRE : <i>Heliopora cærulea</i> PALL.....	379
I. Etude du « pigment brut ».....	380
a. Préparation (p. 380) : 1° décalcification (p. 380); 2° extraction (p. 380); 3° précipitation (p. 381). — b. Propriétés (p. 381) : nature chimique du pigment (p. 381); action des solvants organiques (p. 381); action des bases (p. 381); action des acides (p. 381); réaction de Gmelin (p. 382); étude spectrale (p. 382); sel complexe de zinc (p. 382); action de l'alcool méthylique chlorhydrique (p. 383); produits d'oxydation et de réduction (p. 383). — c. Conclusion (p. 383).	
II. Etude de l'ester méthylique.....	383
a. Préparation (p. 383). α) A partir du polypier (p. 383) : 1° décalcification et estérification (p. 383); 2° extraction (p. 384). β) A partir du « pigment brut » (p. 384) : estérification et extraction (p. 384). — b. Purification (p. 384). — c. Propriétés (p. 384) : solubilités et propriétés des solutions (p. 384); réaction de Gmelin (p. 385); analyse spectrale (p. 385); sel complexe de zinc (p. 386); sel complexe de cuivre (p. 388); oxydation (p. 388); réduction (p. 390); comparaison avec la phycocyanobiline et la mésobilivoline (p. 391); origine du pigment (p. 392). — d. Conclusion (p. 392).	
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	393
BIBLIOGRAPHIE.....	394

INTRODUCTION

Les recherches que nous exposons dans ce travail ont pour objet l'isolement et l'étude de quelques pigments pyrroliques naturels appartenant soit au groupe des porphyrines, soit à celui des bilirubinoïdes. Les pigments pyrroliques sont largement répandus dans les règnes végétal et animal, et jouent un rôle essentiel dans la vie des organismes. Alors que les porphyrines possèdent quatre noyaux pyrrole reliés entre eux en position α par

quatre ponts d'un seul atome de carbone, et forment ainsi une chaîne fermée, les bilirubinoïdes, dérivant des pigments précédents par ouverture du cycle porphyrinique, ont leurs quatre noyaux pyrrole reliés entre eux par trois ponts carbonés en une chaîne linéaire. On tend actuellement à désigner, sous le terme de pigments biliaires, uniquement les pigments pyrroliques provenant de la dégradation du groupement prosthétique de l'hémoglobine et possédant quatre ou même deux noyaux pyrrole, l'expression bilirubinoïde étant réservée aux dérivés tétrapyrroliques naturels ou synthétiques.

Durant ces dernières années, nos connaissances sur les pigments tétrapyrroliques ont été précisées par de nombreuses synthèses et enrichies par l'isolement de nouvelles substances colorantes. En particulier, dans le domaine des bilirubinoïdes, H. FISCHER et H. PLIENINGER ont réalisé les synthèses de la biliverdine et de la bilirubine; W. SIEDEL et H. MÖLLER, celles de la mésobilivioline et de la mésobilirhodine. En outre, grâce à l'emploi de la méthode chromatographique, W. SIEDEL et ses collaborateurs ont séparé les produits d'oxydation de la mésobilirubine, et établi ainsi la constitution chimique des pigments correspondant aux diverses phases colorées de la réaction de Gmelin. Signalons enfin qu'H. WIELAND et A. TARTTER ont isolé des ailes de Papillons une nouvelle biliverdine : la ptérobiline.

Au cours de nos recherches, nous nous sommes plus particulièrement intéressé aux pigments tétrapyrroliques liés à des formations calcaires, tels que les porphyrines des coquilles de Mollusques, la biliverdine des coquilles d'œufs d'Oiseaux, le pigment bleu du squelette calcaire d'*Heliopora cærulea*. Nous avons employé la méthode chromatographique, afin de séparer ces pigments des autres substances colorantes qui les accompagnaient.

Dans ce travail, nous distinguerons deux parties, suivant que les pigments envisagés appartiennent au groupe des porphyrines ou à celui des bilirubinoïdes. Dans la première partie, nous exposerons les recherches concernant les porphyrines des coquilles de Mollusques Bivalves de la famille des Ptéridés (*Pteria macroptera*, *P. margaritifera*), et de Mollusques Gastéropodes de la famille des Trochidés (*Clanculus pharaonis*, *Trochus virgatus* et *T. maculatus*). Dans la deuxième partie, nous envisagerons l'étude de quelques bilirubinoïdes naturels (biliverdine IX α , biliverdine des coquilles d'œufs d'Emeu, pigment bleu du squelette calcaire d'*Heliopora cærulea*).

Après avoir débuté dans la recherche scientifique comme boursier de l'Institut Pasteur, puis comme assistant du Laboratoire de Chimie du Muséum, nous avons poursuivi ce travail en demeurant en relations suivies avec le Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris.

Avant d'aborder notre exposé, nous voulons adresser un hommage ému et respectueux à la mémoire de Monsieur le professeur MARCHOUX, directeur de la Fondation Roux de l'Institut Pasteur.

Nous voulons remercier tout particulièrement Monsieur FLEURY, professeur de Chimie biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris, pour le bienveillant intérêt qu'il nous a témoigné, pour les directives qu'il nous a données et pour l'honneur qu'il nous a fait de bien vouloir présider notre jury de thèse.

Nous adressons nos respectueux remerciements à Monsieur VALETTE, professeur de Zoologie de la Faculté de Pharmacie de Paris, qui a si aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse.

A Monsieur GUILLOT, maître de conférences de la Faculté de Pharmacie de Paris, nous sommes heureux d'exprimer notre très vive reconnaissance.

A Monsieur SANNIÉ, professeur du Laboratoire de Chimie organique du Muséum, nous exprimons nos remerciements les plus vifs pour les facilités qu'il nous a accordées au cours de la réalisation de ce travail.

Nous voulons assurer Monsieur le professeur URBAIN, directeur du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris, de notre très sincère et très respectueuse reconnaissance.

Nous exprimons enfin nos sentiments de profonde gratitude à Monsieur le professeur FAGE, qui a bien voulu accepter de publier ce travail dans les *Annales de l'Institut Océanographique*.

PREMIÈRE PARTIE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PIGMENTS DES COQUILLES DES MOLLUSQUES

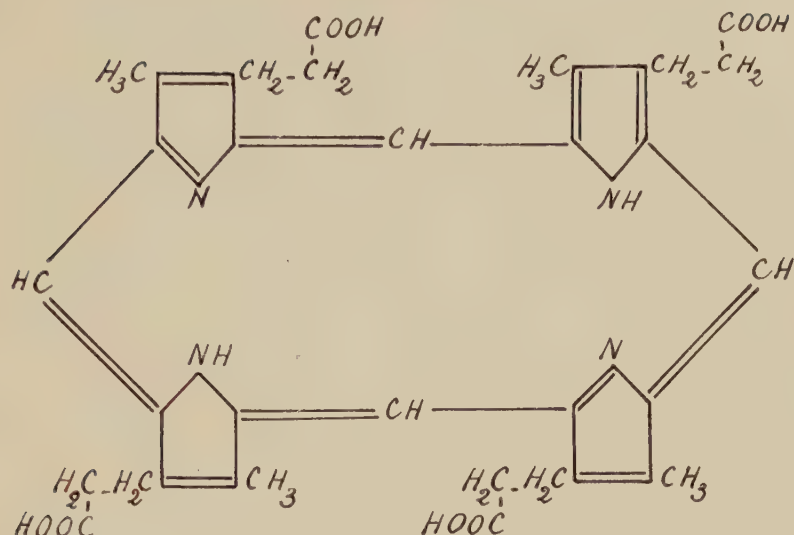
A. — HISTORIQUE

En 1930, H. FISCHER et K. JORDAN [1] parvinrent à isoler, pour la première fois, des coquilles d'une Huître perlière (*Pteria radiata* LAM.), commune sur la côte atlantique du Centre et du Sud de l'Amérique, un pigment rouge fluorescent : la conchoporphyrine; c'est à ce pigment que la couche superficielle externe des coquilles de *Pteria radiata* doit sa fluorescence rouge en lumière ultra-violette.

Après divers essais de décalcification, H. FISCHER et K. JORDAN adoptèrent la technique suivante : les coquilles réduites en poudre sont attaquées par de l'alcool méthylique chlorhydrique qui dissout et estérifie le pigment. Ce dernier, extrait de la solution alcoolique acide par du chloroforme, est décomposé en sa forme neutre par une solution légèrement alcaline, et enfin recristallisé huit fois dans un mélange chloroforme - alcool méthylique bouillant.

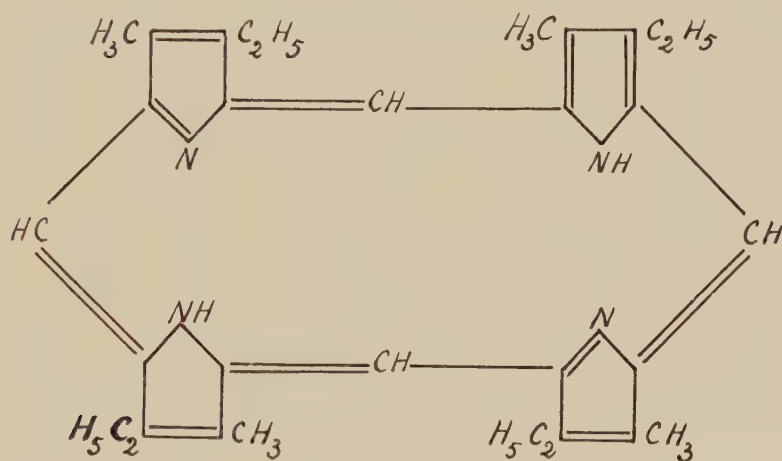
A partir de 94 coquilles, soit 950 gr. environ, H. FISCHER et K. JORDAN obtinrent 35 mgr. d'ester méthylique de conchoporphyrine cristallisée en longues et fines aiguilles rouge brun réunies en amas feutrés de point de fusion 271°-273°.

Par son insolubilité dans l'éther et par son spectre d'absorption dans le visible, ce pigment se rapprochait de l'uroporphyrine. Comme l'analyse élémentaire s'accordait avec la formule $C_{42}H_{48}O_{10}N_4$, et que le dosage des groupements méthoxyle indiquait la présence de cinq fonctions carboxyle, H. FISCHER et K. JORDAN pensèrent avoir isolé un corps intermédiaire entre l'uroporphyrine, qui renferme huit groupes carboxyle, et la coproporphyrine, qui ne possède que quatre fonctions acides. Cette hypothèse semblait confirmée par la facile décarboxylation de la conchoporphyrine en coproporphyrine I, à l'aide d'acide chlorhydrique à 1 % en tube scellé à 180° :



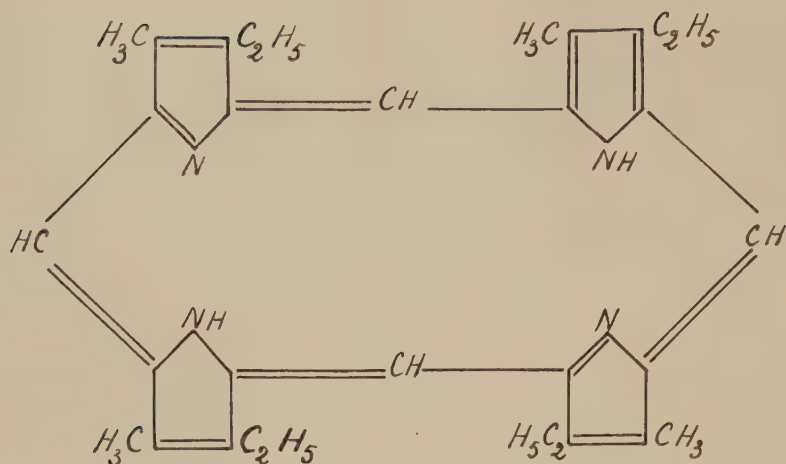
Coproporphyrine I.

L'obtention d'une coproporphyrine I permettait, en outre, de considérer la conchoporphyrine comme dérivant de l'étioporphyrine I :



Etioporphyrine I.

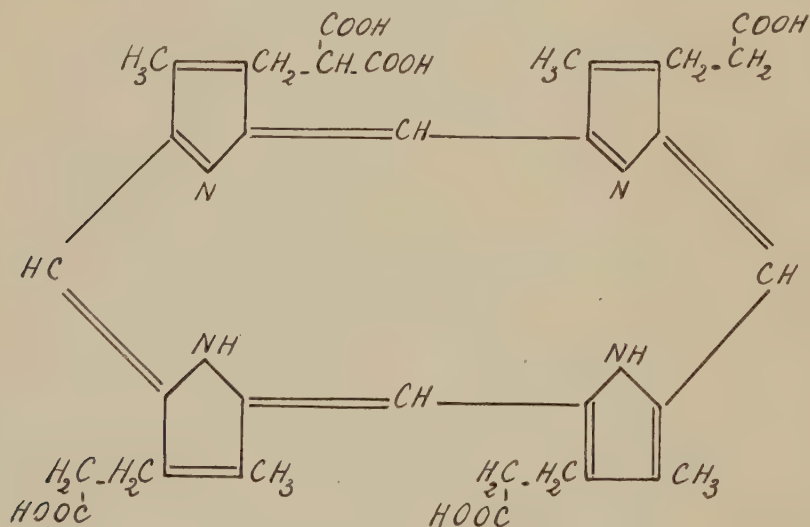
Il existe, en effet, quatre étioporphyrines distinctes les unes des autres par les positions respectives des groupes méthyle et éthyle des noyaux pyrroliques. De ces quatre isomères possibles de l'étioporphyrine dérivent quatre types de porphyrines désignés par les chiffres romains I, II, III et IV. Seules, les porphyrines dérivant des types I et III se rencontrent dans la nature :



Etioporphyrine III.

C'est ainsi que les groupements prosthétiques de l'hémoglobine, de la myoglobine, du cytochrome C, de la catalase et des ferments respiratoires dérivent de l'étioporphyrine III. Les coproporphyrines et les uroporphyrines naturelles appartiennent tantôt au type I, tantôt au type III, alors que la protoporphyrine naturelle, dérivant de l'hémoglobine, se rattache au type III. Le passage direct d'une porphyrine du type I à une porphyrine du type III est chimiquement impossible. De même, les êtres vivants ne peuvent effectuer la transformation directe d'une porphyrine du type I en une porphyrine III, mais doivent synthétiser les porphyrines de l'une ou de l'autre série à partir de restes pyrroliques simples et selon deux processus différents.

La conchoporphyrine possédant cinq fonctions acides et donnant par décarboxylation la coproporphyrine I, H. FISCHER et K. JORDAN proposèrent la formule suivante :

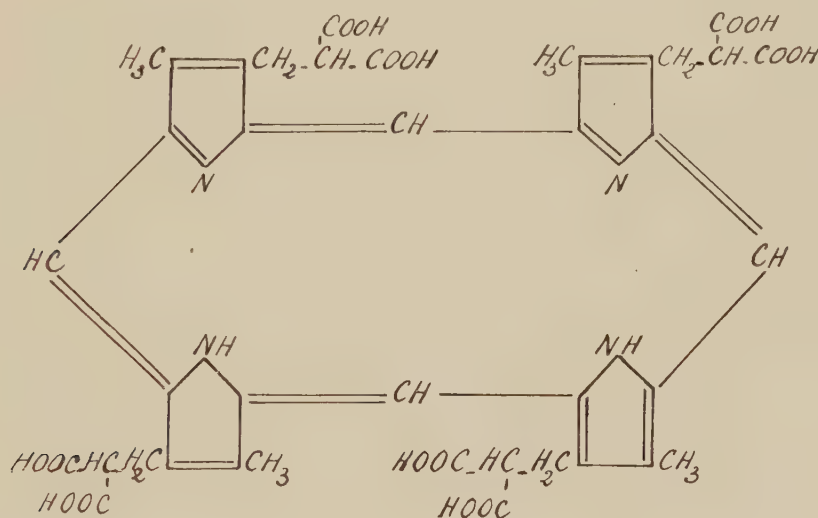


Dans ce mémoire, les auteurs signalèrent la fluorescence rouge des coquilles d'*Avicula lentigenosa* et d'*A. castanea*, mais ne purent entreprendre l'isolement des pigments fluorescents de ces coquilles par suite de l'insuffisance de la matière première.

En 1932, H. FISCHER et E. HAARER [2], reprenant ces recherches, isolèrent le pig-

ment fluorescent d'une autre espèce d'Huitre perlière, originaire du Golfe Persique, *Pteria vulgaris* SCHUM. A partir de 2 kgr. de coquilles, ces chimistes obtinrent 20 mgr. d'ester méthylique de la porphyrine cristallisé en longues aiguilles brun rouge, courbes, réunies en amas feutrés, de point de fusion 293°. Or, cet aspect cristallin est identique à celui de l'ester méthylique de l'uroporphyrine I. En outre, le point de fusion mixte des esters méthyliques de ces deux pigments (porphyrine de *P. vulgaris* et uroporphyrine I) ne montre aucun abaissement. De plus, l'analyse élémentaire s'accorde avec la formule de l'uroporphyrine $C_{48}H_{53}O_{16}N_4$; enfin, les spectres d'absorption des solutions de ces deux pigments sont superposables et la décarboxylation de cette nouvelle porphyrine donne une coproporphyrine I. C'est pourquoi H. FISCHER et E. HAARER conclurent à l'identité du pigment de *Pteria vulgaris* et de l'uroporphyrine I. Cette uroporphyrine I, qui fut isolée de l'urine d'un malade atteint d'hématoporphyrine congénitale (de Petry), est une coproporphyrine I tétracarboxylée.

Par ailleurs, H. FISCHER essaya d'établir la constitution de l'uroporphyrine I (isolée par cet auteur dès 1915) [3], en préparant par synthèse des coproporphyrines tétracarboxylées. Par suite de la facile décarboxylation de l'uroporphyrine I en coproporphyrine I, H. FISCHER et ses élèves [4] [5] pensèrent que les deux fonctions acides de chaque noyau pyrrole étaient fixées sur un même carbone (comme dans l'acide malonique), et préparèrent par synthèse une iso-uroporphyrine I possédant la structure suivante :

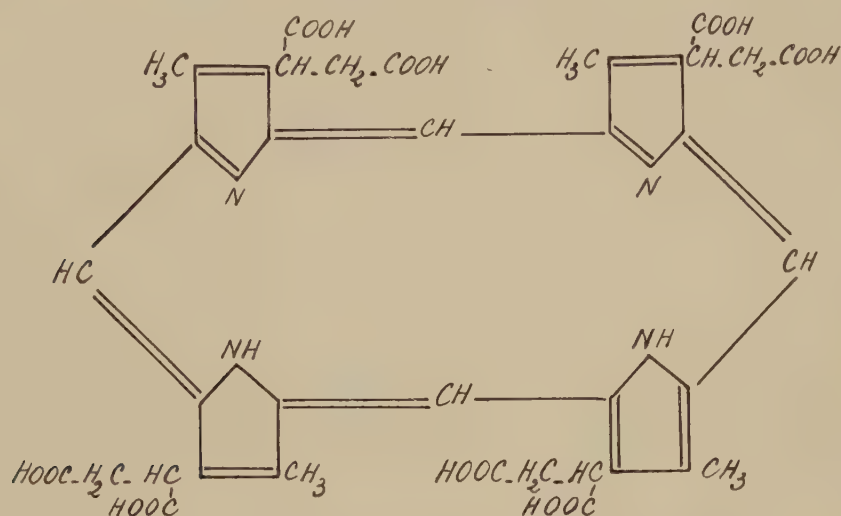


Iso-uroporphyrine I (acide 1, 3, 5, 7-tétraméthylporphine - 2, 4, 6, 8-tétramalonique).

L'ester méthylique de l'iso-uroporphyrine I diffère cependant de l'ester méthylique de l'uroporphyrine naturelle par son point de fusion moins élevé (284°, au lieu de 292°), et par l'abaissement notable du point de fusion mixte (269°).

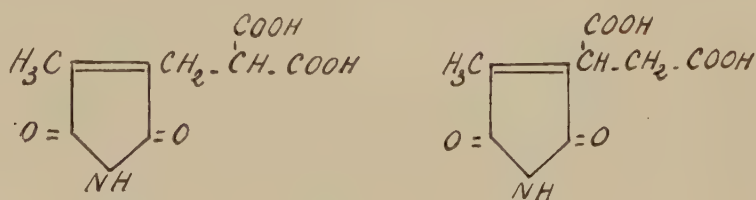
H. FISCHER et E. VON HOLT [6] firent également la synthèse d'une coproporphyrine monocarboxylée correspondant à la formule proposée antérieurement pour la conchoporphyrine. Cette porphyrine synthétique (iso-conchoporphyrine I) se montre distincte de la conchoporphyrine naturelle par son point de fusion (172°, au lieu de 273°), par son

aspect cristallin et par son spectre d'absorption. H. FISCHER et ses collaborateurs [7] [8] préparèrent alors une nouvelle uroporphyrine synthétique (l'acide 1, 3, 5, 7-tétraméthylporphine - 2, 4, 6, 8-tétrasuccinique), dans laquelle les deux fonctions acides de chaque noyau pyrrole étaient disposées comme dans l'acide succinique :

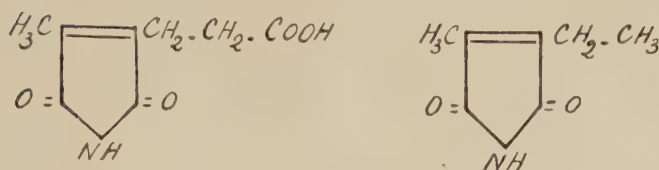


Cette nouvelle uroporphyrine I synthétique, à caractères spectroscopiques identiques à ceux de l'uroporphyrine I naturelle, diffère cependant de cette dernière par son point de fusion moins élevé et par ses propriétés cristallographiques.

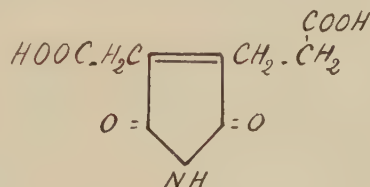
Par ailleurs, H. J. HOFMANN [9] [10] purifiant, par chromatographie sur talc, l'ester méthylique d'une uroporphyrine extraite d'une urine de Petry et de point de fusion 286°, en sépara une uroporphyrine III de point de fusion 261° (identique à celle de WALDENSTRÖM [11] [12], et une uroporphyrine I de point de fusion 302° (non corrigé), 311° (corrigé). Les points de fusion anormaux de diverses uroporphyrines naturelles s'expliquent ainsi, dans la plupart des cas, par la présence simultanée des isomères I et III. C'est l'étude des produits de dégradation de l'uroporphyrine naturelle (de Petry) qui a permis à FISCHER [13] d'établir la formule de l'uroporphyrine I. En effet, l'acide hématinique carboxylique obtenu par oxydation de l'uroporphyrine I naturelle diffère des acides hématiniques carboxyliques des uroporphyrines I synthétiques qui répondent aux formules suivantes :



Or, l'acide hématinique carboxylique de l'uroporphyrine I naturelle donne, par dégradation de l'acide hématinique et de la méthyléthylmaléimide :

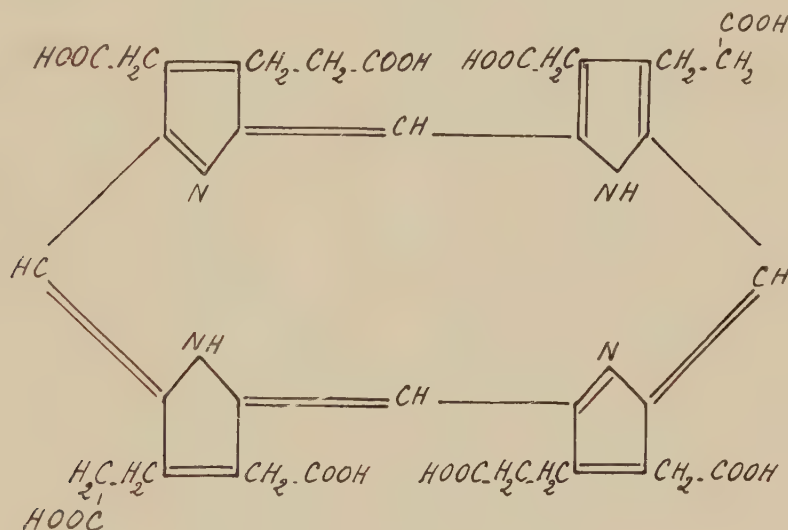


Cet acide ne peut donc être représenté que par la formule suivante :



qui en fait un dérivé de la maléinimide avec des restes acide acétique et acide propionique.

L'uroporphyrine I naturelle possède donc la constitution suivante :



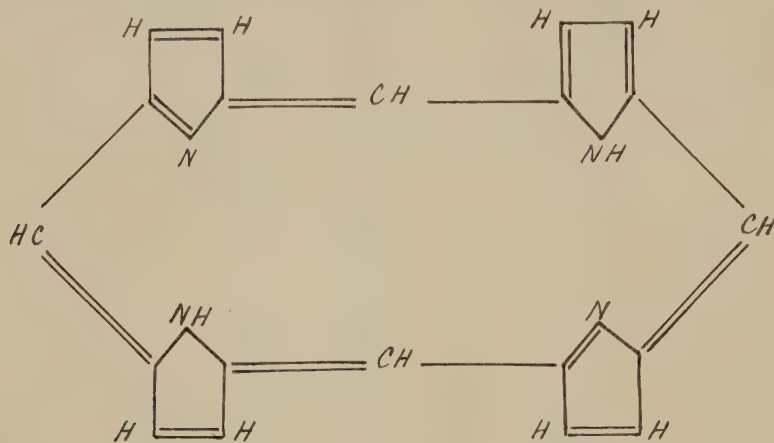
Uroporphyrine I.

L'uroporphyrine de *Pteria*, donnant par oxydation un acide hématinique carboxylique identique à celui de l'uroporphyrine I, possède donc une constitution analogue. Une certaine différence demeure cependant dans les points de fusion : l'uroporphyrine I très pure fond à 301° , alors que le point de fusion le plus haut observé pour l'uroporphyrine de *Pteria radiata* est de 287° . Toutefois, par chromatographie d'un mélange des deux pigments, aucune séparation des deux substances colorantes n'a lieu ; aussi, H. FISCHER conclut-il à l'identité des deux produits.

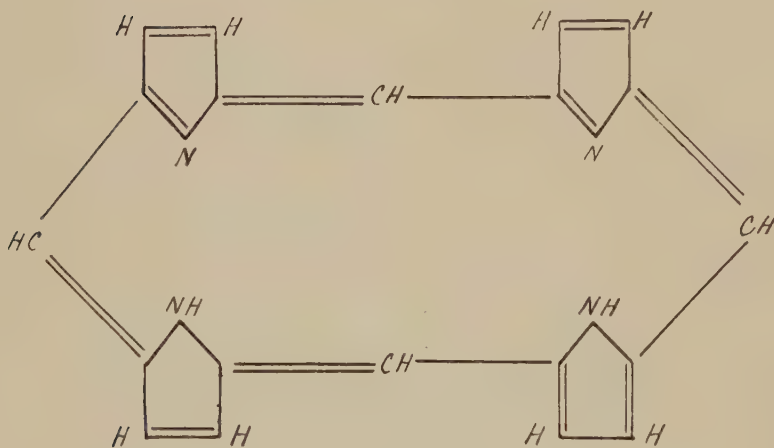
En résumé, la conchoporphyrine de *Pteria radiata* et la porphyrine de *P. vulgaris* s'identifient avec l'uroporphyrine I.

Nous ferons remarquer que les différences de position des atomes d'H sur l'N dans

les formules données au cours de cet exposé sont dues au fait que, depuis les travaux de STERN [14] de 1936, la structure A est employée de préférence à la formule B pour la porphine, substance d'où dérivent toutes les porphyrines :



Porphine : formule A.



Porphine : formule B.

B. — RECHERCHES PERSONNELLES

I. — Porphyrine des coquilles de *Pteria (Avicula) macroptera* LMK.

Rappelons que les Ptéridés sont des Mollusques Bivalves Anisomyaires appartenant au groupe des Ptériacés. La coquille de *Pteria (Avicula) macroptera* LMK est oblongue, oblique, plus ou moins gibbeuse, brunâtre, nacrée intérieurement et présente, du côté antérieur, un prolongement long et étroit. Les deux exemplaires mis à notre disposition (1) étaient originaires de Zanzibar et mesuraient environ 12 cm. de long,

(1) Nous devons notre matériel à l'amabilité de M. E. FISCHER, professeur de Malacologie au Muséum national d'Histoire naturelle, qui nous a fait savoir que les genres *Pteria*, *Avicula* et *Margaritifera* se groupent tous actuellement sous le vocable unique de *Pteria* (famille des *Pteridæ*).

10 à 15 cm. de large, chaque valve pesant à peu près 200 gr. La surface externe brunâtre, et plus particulièrement les bords noirâtres de la face interne montrant une nette fluorescence rouge en lumière ultra-violette, nous avons tenté l'extraction du pigment fluorescent en suivant la technique préconisée par H. FISCHER [15]. En outre, nous avons employé la méthode chromatographique pour séparer ce pigment fluorescent des autres matières colorantes brunâtres qui le souillent.

A. — PRÉPARATION

1° DÉCALCIFICATION ET ESTÉRIFICATION. — Les deux coquilles (quatre valves), d'un poids global de 800 gr. environ, sont concassées en menus fragments dans un mortier de bronze; les fragments pigmentés, séparés autant que possible des éclats de nacre non colorés, sont traités par 1 litre d'alcool méthylique chlorhydrique contenant 10 gr. de gaz chlorhydrique pour 100 cc. d'alcool. Lorsque le dégagement d'acide carbonique se ralentit, nous faisons passer lentement, pendant trois heures environ, un courant de gaz chlorhydrique dans la solution alcoolique, afin de poursuivre l'attaque du substrat calcaire et la dissolution des pigments. Le mélange réactionnel est alors abandonné pendant une nuit et la solution alcoolique rouge brun, fluorescente, séparée, par filtration sur un entonnoir de Büchner, des résidus calcaires encore pigmentés. Ces fragments calcaires, fluorescents en lumière ultra-violette, sont de nouveau traités par 1 litre d'alcool méthylique chlorhydrique, comme précédemment, et la nouvelle solution brunâtre, fluorescente, séparée et mélangée à la première. Ces deux opérations successives sont suffisantes pour extraire toute la porphyrine des coquilles. Il est inutile de poursuivre plus avant la destruction du substrat calcaire, les résidus brunâtres ne présentant plus, en effet, aucune fluorescence rouge en lumière ultra-violette.

La solution alcoolique rouge brun de la porphyrine estérifiée (2 litres environ) est additionnée de 500 cc. de chloroforme, puis d'eau distillée jusqu'à formation d'un précipité blanchâtre floconneux et séparation de la couche chloroformique. Après décantation et filtration sur de la gaze, la couche chloroformique rouge brun, débarrassée des flocons, est lavée trois fois avec 100 cc. d'eau distillée (ce qui enlève les sels minéraux), deux fois avec 100 cc. d'une solution de carbonate de sodium à 5 % (ce qui élimine un pigment brunâtre non fluorescent), enfin trois fois à l'eau distillée. Dans ces conditions, la solution de carbonate de sodium transforme la porphyrine, qui en milieu acide se trouvait à l'état de chlorhydrate, en sa forme neutre, sans toutefois saponifier les fonctions esters méthyliques. La solution chloroformique rouge brunâtre fluorescente est ensuite filtrée et déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre.

2° PURIFICATION DU PIGMENT PAR CHROMATOGRAPHIE. — La solution chloroformique filtrée est, après concentration à 50 cc., additionnée d'un égal volume d'éther anhydre et le mélange est alors filtré sur une colonne d'alumine Prolabo (hauteur : 20 cm.; diamètre : 1,2 cm.). Les pigments se concentrent à la partie supérieure de la colonne en une couche grisâtre de 4 cm. environ, à l'intérieur de laquelle se forme peu à peu une zone rougeâtre (fig. 1, a). En outre, un pigment jaune peu abondant s'élimine à travers la colonne. La zone rougeâtre fluorescente est ensuite détachée de la couche grisâtre supérieure à l'aide de 200 cc. environ d'un mélange de deux volumes de chloroforme pour un

volume d'éther anhydre (fig. 1, *b*). Cette zone descend assez rapidement en un anneau large de 3 cm. environ, nettement délimité; lorsque cette zone atteint le bas de la colonne d'alumine, nous recueillons le solvant (50 cc. environ) qui filtre en entraînant le pigment rouge. A la suite de cette zone rouge se détache une zone rouge violacé peu importante, à fluorescence orange. La couche grisâtre, demeurant à la partie supérieure de la colonne d'alumine, ne présente plus aucune fluorescence. Après avoir sorti la colonne d'alumine du tube à chromatographier, nous séparons la zone rouge violacé et nous éluons le pigment à l'aide de chloroforme.

Nous obtenons ainsi : 1° Une solution chloroformique rouge à fluorescence rouge intense, dont le spectre d'absorption à cinq bandes est caractéristique des porphyrines neutres. 2° Une solution chloroformique rouge violacé à fluorescence orange, dont le

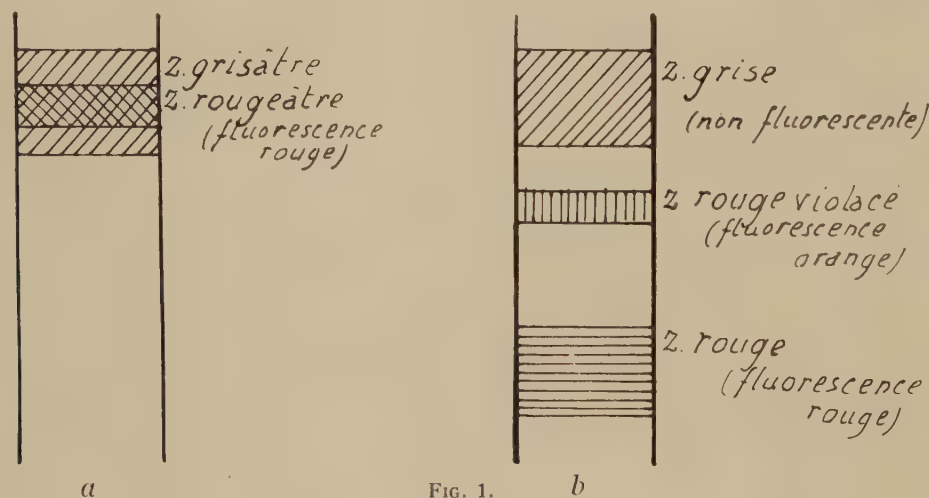


FIG. 1.

spectre d'absorption diffère de celui des porphyrines neutres et ne présente que deux maxima d'absorption, d'égale intensité, l'un à λ 560 μ , l'autre à λ 598 μ . Ce pigment rouge violacé n'étant obtenu qu'en très faible quantité et à l'état impur, nous n'avons pas poursuivi son étude.

Par évaporation spontanée de la solution chloroformique rouge, la porphyrine cristallise en longs et fins cristaux rouges, courbes, enchevêtrés. Ces cristaux sont mis en suspension dans une petite quantité d'acétate d'éthyle qui enlève des traces de pigment orangé, et la liqueur est centrifugée, le résidu desséché dans le vide.

Une nouvelle chromatographie montre l'homogénéité du pigment rouge. Ce dernier est finalement recristallisé au sein d'un mélange chloroforme-acétate d'éthyle, centrifugé et desséché dans le vide. Des deux coquilles de *Pteria macroptera*, nous avons extrait 22 mgr. de l'ester méthylique de la porphyrine.

B. — PROPRIÉTÉS

L'ester méthylique de la porphyrine ainsi isolé sous forme de longues aiguilles rouges, très fines, courbes, enchevêtrées en amas feutrés (aspect de « touffes de cheveux » des uroporphyrines), fond au bloc de Maquenne à 295°; ce point de fusion est analogue

à ceux des esters méthyliques de l'uroporphyrine I (293°) [16], de l'uroporphyrine de *Pteria vulgaris* (293°) et de l'uroporphyrine de *P. radiata* (287°) [17]. Rappelons toutefois que H. FISCHER et H. J. HOFMANN ont pu séparer, par chromatographie sur talc, les esters méthyliques d'une uroporphyrine I de point de fusion 301° (non corrigé) et d'une uroporphyrine III de point de fusion 261°.

Comme l'ester méthylique de l'uroporphyrine I, le pigment de *Pteria macroptera* est très soluble dans le chloroforme, insoluble dans l'éther, l'acétate d'éthyle et l'acide acétique pur ou additionné d'eau distillée. Les coproporphyrines aux caractères spectroscopiques voisins de ceux des uroporphyrines sont, contrairement à ces dernières, solubles dans l'éther. Enfin, l'ester méthylique de l'uroporphyrine III se distingue de l'ester méthylique de l'uroporphyrine I par sa solubilité dans l'acétate d'éthyle et l'acide acétique pur ou dilué.

Par suite de la faible quantité de pigment à notre disposition, nous n'avons effectué qu'un seul microdosage selon la méthode de Dumas. Ce dosage a donné une teneur en azote de 5,74 %; le taux d'azote des esters méthyliques des uroporphyrines est de 5,95 %.

SPECTRE DANS L'ULTRA-VIOLET. — Les solutions porphyriques présentent, à la limite du visible et de l'ultra-violet, une bande d'absorption assez caractéristique dont le maximum se situe aux environs de λ 400 m μ . Nous avons observé, pour le pigment de *Pteria macroptera* en solution chloroformique, un minimum d'absorption dans l'ultra-violet à λ 275 m μ , et un maximum à λ 408 m μ ; nous n'avons pu déterminer avec la même précision le second minimum vers λ 465 m μ . Ces mesures correspondent exactement à celles indiquées par W. HAUSSMANN et O. KRUMPEL [18] pour l'ester méthylique de l'uroporphyrine en solution chloroformique : maximum à λ 408 m μ , minima à λ 275 m μ et λ 466 m μ , le maximum d'absorption de l'ester méthylique de la coproporphyrine se situant à λ 405 m μ , les minima à λ 264 m μ et à λ 463 m μ .

Esters méthyliques	Minimum	Maximum	Minimum
Porphyrine de <i>Pteria macroptera</i>	λ 275 m μ	λ 408 m μ	vers λ 465 m μ
Uroporphyrine	λ 275 m μ	λ 408 m μ	λ 466 m μ
Coproporphyrine	λ 264 m μ	λ 405 m μ	λ 463 m μ

SPECTRE DANS LE VISIBLE. — Nous avons étudié l'absorption dans le visible de la solution chloroformique neutre de l'ester méthylique de la porphyrine de *Pteria macroptera* à l'aide du spectrophotomètre de G. Yvon et A. Jobin, qui nous permet de déterminer la densité optique ε des solutions examinées ($\varepsilon = \log. \frac{I_0}{I}$). Le coefficient d'extinction moléculaire ε mol. est calculé d'après la formule ε mol. = $\frac{1}{cd}$ ε , c étant la concentration molaire de la solution et d l'épaisseur de la cuve. L'épaisseur de cette dernière étant de 1 cm., la formule devient ε mol. = $\frac{1}{c}$ ε , et $\log. \varepsilon$ mol. = $\log. \frac{\varepsilon}{c}$. Les concentrations des solutions étudiées étaient $\frac{M}{4.000}$ et $\frac{M}{8.000}$. Cette solution présente les cinq bandes d'absorption (I, Ia, II, III et IV) caractéristiques des porphyrines dérivant des étio-

porphyrines. La bande Ia, très faible, n'est perceptible qu'avec une solution suffisamment concentrée; l'intensité de l'absorption des autres bandes croît de I à IV (fig. 2).

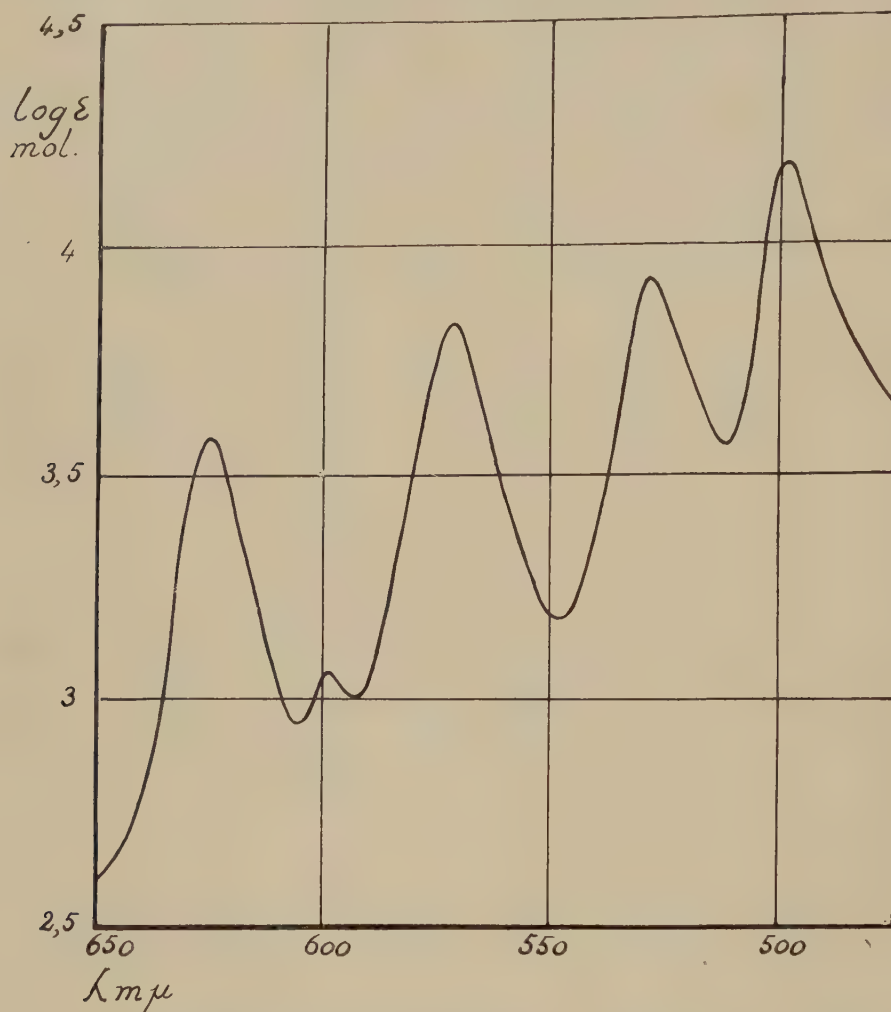


FIG. 2. — Courbe d'absorption de l'ester méthylique de la porphyrine de *Pteris macroptera*.

Les positions des maxima et des minima de ces bandes et les coefficients d'extinction moléculaire correspondants sont indiqués dans les tableaux I et II.

TABEAU I

TABEAU II

Maxima	A		B		C		Minima	A		B		C	
	λ mμ	log. ε mol.	λ mμ	log. ε mol.	λ mμ	log. ε mol.		λ mμ	log. ε mol.	λ mμ	log. ε mol.	λ mμ	log. ε mol.
I	625	3,57	624	3,59	623,5	3,61	I	605	2,92	605	2,86	606	2,84
Ia	600	3,18	597	3,15	597	3,14	II	595	3,00	593	3,10	593,5	3,11
II	570	3,83	569	3,84	596	3,85	III	550	3,17	551	3,14	551	3,18
III	532	3,96	531	3,96	532	3,92	IV	517	3,52	518	3,52	519	3,54
IV	500	4,20	499	4,18	499	4,19							

Esters méthyliques des uroporphyrines :

A : de *Pteris macroptera* ; B : de *Pteris radiata* ; C : d'une urine de Petry.

En outre, nous donnons dans ces tableaux les positions des maxima et des minima, ainsi que les coefficients d'extinction moléculaire (calculés à partir des données fournies par H. FISCHER et H. ZISCHLER [19] en $\epsilon \cdot 10^4$) des uroporphyrines isolées des coquilles de *Pteria radiata* et d'une urine porphyrinique de Petry. Les résultats spectrophotométriques trouvés avec le pigment de *Pteria macroptera* sont entièrement comparables à ceux de ces uroporphyrines.

SEL COMPLEXE DE CUIVRE. — Préparation : Une solution de 5 mgr. de l'esther méthylique de la porphyrine de *Pteria macroptera* dans 5 cc. de chloroforme est additionnée de 5 cc. d'acide acétique pur saturé d'acétate de cuivre. Le mélange étant porté au bain-marie, le chloroforme s'évapore et le sel complexe de cuivre cristallise dans la liqueur acétique. Séparé par centrifugation, le produit cristallin est ensuite lavé plusieurs fois à l'eau distillée, puis séché dans le vide en présence d'acide sulfurique. Le sel complexe de cuivre est ensuite dissous dans 5 cc. de chloroforme, et la solution obtenue est additionnée d'un égal volume d'acétate d'éthyle. Par évaporation lente, le sel complexe rouge vif cristallise au sein du solvant. Recueilli, puis recristallisé dans le mélange chloroforme - acétate d'éthyle, il est finalement séparé par centrifugation, puis desséché dans le vide.

Propriétés : A l'examen microscopique, le sel complexe de cuivre apparaît cristallisé en fines aiguilles rouge vif, courbes, souvent réunies en amas (aspects de gerbes). Chauffé au bloc de Maquenne, ce sel complexe fond à 345° - 346° ; or, le sel de cuivre de l'esther méthylique de l'uroporphyrine I fond à 346° - 348° , alors que celui de l'uroporphyrine III fond à 304° [20]. Signalons, en outre, que les points de fusion des sels complexes de cuivre des esters méthyliques des coproporphyrines sont inférieurs à 300° .

Ce sel complexe est soluble dans le chloroforme, insoluble dans l'acétate d'éthyle et l'acide acétique. Le spectre dans le visible de la solution chloroformique est identique à celui des sels complexes de cuivre des uroporphyrines. La courbe d'absorption (fig. 3) montre en effet deux maxima situés : l'un à λ 565 $m\mu$, l'autre à λ 528 $m\mu$; le spectre de la solution chloroformique du sel de cuivre de l'uroporphyrine III comprend deux bandes : l'une à λ 565,3 $m\mu$; l'autre, plus floue, à λ 528 $m\mu$. Ne connaissant pas la concentration c de la solution examinée, nous avons établi la courbe d'absorption en $\log. \epsilon$ (non moléculaire), d'après la formule : $\log. \epsilon = \log. \delta$.

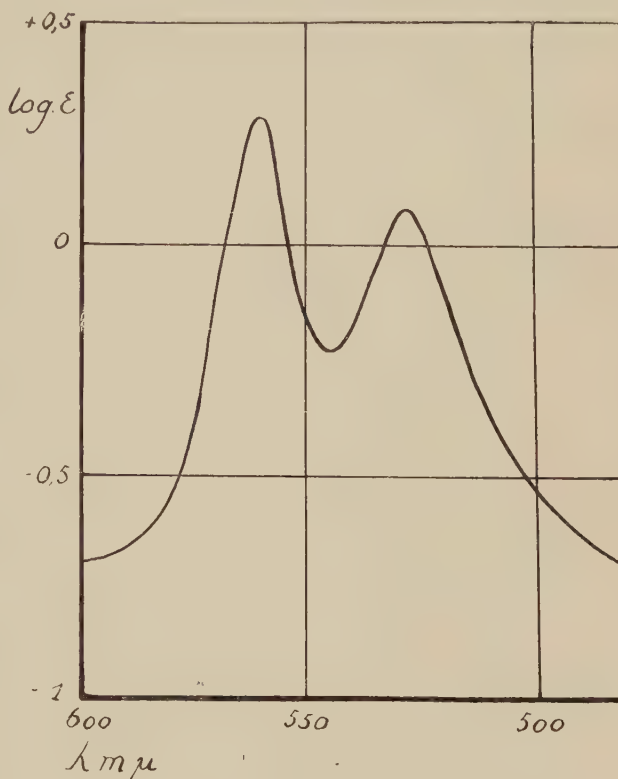


FIG. 3. — Courbe d'absorption du sel complexe de cuivre de la porphyrine de *Pteria macroptera*.

C. — CONCLUSION

L'analyse chromatographique nous a permis d'isoler facilement la porphyrine des coquilles de *Pteria macroptera* des autres pigments brunâtres qui l'accompagnaient. Par son aspect cristallin, sa teneur en azote, ses spectres et ses solubilités, cette porphyrine s'apparente aux uroporphyrines. Par son point de fusion et par celui de son sel complexe de cuivre, ainsi que par ses solubilités, elle se distingue de l'uroporphyrine III et s'identifie avec l'uroporphyrine I des coquilles de *Pteria radiata* et *P. vulgaris*. Enfin, au cours de la chromatographie, nous n'avons pas décelé la présence de l'uroporphyrine III qui accompagne généralement l'uroporphyrine I dans les cas de porphyries.

II. — Porphyrine des coquilles de *Pteria margaritifera* L.

A. — PRÉPARATION

L'Huître perlière *Pteria (Meleagrina) margaritifera* L., originaire des mers tropicales, est connue sous les noms de méléagrine ou de pentadine. Elle est particulièrement estimée pour les perles fines qu'elle produit et pour la nacre de ses valves. La coquille

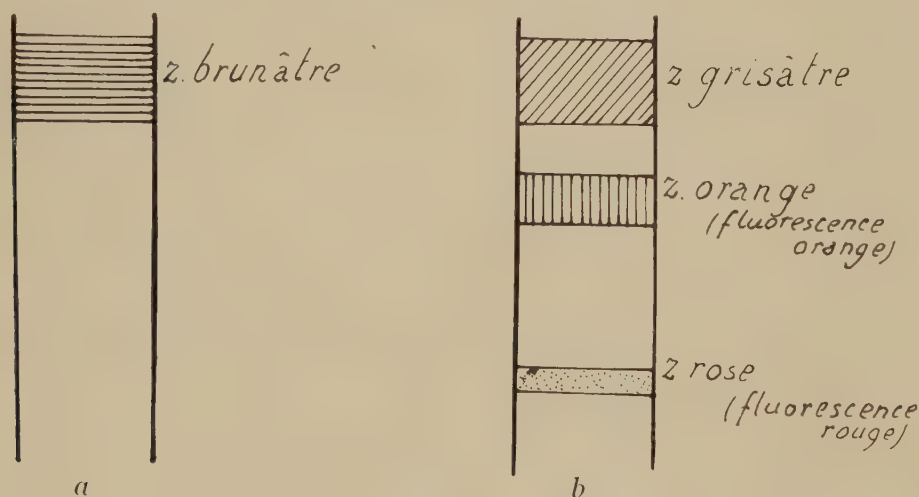


FIG. 4.

est orbiculaire, noirâtre, moins oblique que celle de *Pteria macroptera*; les valves sont plus aplaties. Bien que cette coquille ne présente aucune fluorescence rouge en lumière ultra-violet, nous traitons une de ses valves par la technique précédente. Nous obtenons ainsi 25 cc. d'une solution chloroformique brunâtre que nous soumettons, après addition d'un égal volume d'éther, à l'analyse chromatographique. La solution éthéro-chloroformique est filtrée sur une colonne d'alumine qui retient les pigments dans sa portion supérieure (fig. 4, a). A l'aide d'un mélange de deux volumes de chloroforme pour un volume d'éther, nous détachons de la couche supérieure brunâtre une mince zone rose à fluorescence rouge en lumière ultra-violet; cette zone descend rapidement le long de la colonne d'alumine. Nous séparons en outre, à l'aide de chloroforme

pur, une zone orange, tandis qu'une couche grisâtre non fluorescente demeure au sommet de la colonne (fig. 4, b).

Nous obtenons ainsi : 1° Une solution chloroformique orange à fluorescence orange qui, examinée au spectrophotomètre, ne montre aucun maximum d'absorption dans le visible. 2° Une solution rose à fluorescence rouge présentant le spectre d'absorption des porphyrines.

B. — PROPRIÉTÉS

Les maxima des bandes d'absorption de la solution chloroformique rose correspondent à ceux que nous avons observés avec l'ester méthylique de l'uroporphyrine de *Pteria macroptera* : I : λ 625 m μ ; II : λ 570 m μ ; III : λ 532 m μ ; IV : λ 500 m μ . La teneur en porphyrine de la coquille de *Pteria margaritifera* est trop faible pour pouvoir tenter l'isolement de ce pigment.

C. — CONCLUSION

L'analyse chromatographique permet de déceler la présence en très faible quantité d'une uroporphyrine dans les coquilles de *Pteria margaritifera*.

III. — Porphyrine des coquilles de *Clanculus pharaonis* L.

A. — PRÉPARATION

Les Trochidés sont des Mollusques Gastéropodes Prosobranches du groupe des Trochacés. Nous avons, en particulier, examiné les coquilles de *Clanculus pharaonis*, de *Trochus virgatus* et de *T. maculatus*. La coquille de *Clanculus pharaonis* L. est conoïde ou turbinée, rouge corail avec des granulations noires et blanches; elle présente en lumière ultra-violette une fluorescence rouge sombre. 22 coquilles entières, soit 20 gr., provenant de la Mer Rouge, sont attaquées par l'alcool méthylique chlorhydrique qui dissout et estérifie le pigment. La solution alcoolique rouge fluorescente, séparée des coquilles décolorées, est additionnée de chloroforme et d'eau distillée. La couche chloroformique contenant le pigment fluorescent est ensuite lavée avec une solution alcaline, puis déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre.

Le comportement chromatographique du pigment fluorescent des coquilles de *Clanculus* est identique à celui de l'uroporphyrine de *Pteria macroptera*. En effet, à l'aide d'un mélange de deux volumes de chloroforme pour un volume d'éther, nous détachons le pigment qui descend en une zone rose à fluorescence rouge intense le long de la colonne d'alumine et filtre. En haut de la colonne demeure une couche brunâtre présentant, aux rayons ultra-violets, une zone supérieure à fluorescence rouge sombre et une zone inférieure à fluorescence verte.

B. — PROPRIÉTÉS

Par évaporation de la solution chloroformique rose recueillie au bas de la colonne d'alumine, le pigment cristallise en longues aiguilles fines, réunies en amas feutrés (aspect de touffes de cheveux des uroporphyrines). Ce pigment est soluble dans le chloroforme,

insoluble dans l'éther. Le spectre de sa solution chloroformique est superposable à celui de l'ester méthylique de l'uroporphyrine de *Pteria macroptera* : I : λ 625 m μ ; II : λ 572 m μ ; III : λ 532 m μ ; IV : λ 500 m μ .

Enfin, une chromatographie mixte sur alumine de l'ester méthylique de l'uroporphyrine de *Pteria macroptera* et du pigment fluorescent de *Clanculus* n'a donné aucune séparation de ces deux pigments.

C. — CONCLUSION

La porphyrine des coquilles de *Clanculus pharaonis* présente les caractères d'une uroporphyrine probablement identique à celle des coquilles de *Pteria macroptera*.

IV. — Porphyrines des coquilles de *Trochus virgatus* GMELIN et de *Trochus maculatus* L.

A. — PRÉPARATION

Deux coquilles de *Trochus virgatus* GMELIN et trois coquilles de *T. maculatus* L., coniques, avec des taches roses ou brunâtres, originaires de l'Océan Indien et pesant chacune 20 gr. environ, sont traitées selon la technique décrite antérieurement. Dans les deux cas, nous avons séparé par chromatographie, à l'aide d'un mélange de deux volumes de chloroforme pour un volume d'éther, une mince zone rose à fluorescence rouge intense; au sommet de la colonne demeure une couche brunâtre.

B. — PROPRIÉTÉS

Les solutions chloroformiques roses obtenues dans les deux cas ont des spectres d'absorption superposables à ceux de l'ester méthylique de l'uroporphyrine de *Pteria macroptera* : I : λ 625 m μ ; II : λ 572 m μ ; III : λ 533 m μ ; IV : λ 500 m μ .

C. — CONCLUSION

Les porphyrines des coquilles de *Trochus virgatus* et de *T. maculatus* présentent les caractères spectroscopiques de l'uroporphyrine de *Pteria macroptera*. Ainsi, par l'emploi de la méthode chromatographique, nous avons décelé la présence, dans les coquilles de Trochidés (*Clanculus* et *Trochus*), d'une porphyrine analogue, par ses caractères spectroscopiques, à l'uroporphyrine de *Pteria macroptera*.

DEUXIÈME PARTIE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU PIGMENT BLEU D'UN OCTOCORALLIAIRE
(*HELIOPORA CÆRULA* Pall.),
DE LA BILIVERDINE IX α ET DU PIGMENT DES COQUILLES D'ŒUFS D'ÉMEU
(*DROMICEIUS NOVÆ HOLLANDIÆ* [Latham])

Les recherches exposées dans ce travail ont été subordonnées au désir que nous avions à l'origine d'élucider la nature chimique, alors totalement inconnue, du pigment d'un Octocoralliaire : *Heliopora cærulea* ou corail bleu.

Nos premières observations nous ont conduit à rapprocher cette matière colorante des pigments biliaries et à la comparer, en particulier, aux bilirubinoïdes liés à des formations calcaires telles que le pigment bleu de certaines coquilles d'œufs d'Oiseaux. C'est l'obtention d'un ester méthylique, soluble dans le chloroforme, qui nous a permis de ranger ce pigment parmi les bilirubinoïdes du groupe de la biliverdine.

Aussi, afin de préciser les relations du pigment d'*Heliopora* avec les pigments biliaries, avons-nous préparé l'ester méthylique de la biliverdine IX α purifié par chromatographie, et avons-nous étudié ses spectres d'absorption dans l'ultra-violet et le visible. En outre, ayant à notre disposition deux coquilles vert foncé d'œufs d'Emeu, nous avons pu en isoler le pigment bleu grâce à l'emploi de la méthode chromatographique, observer ses propriétés spectroscopiques et envisager ses relations avec la biliverdine IX α .

Finalement, nous avons pu comparer les propriétés du pigment d'*Heliopora* avec celles de la biliverdine IX α et celles du pigment bleu des œufs d'Emeu.

A. — HISTORIQUE

Avant d'exposer nos recherches, nous donnerons un bref aperçu de la répartition chez les êtres vivants de quelques pigments biliaries dont nous aurons à parler au cours de notre travail. Malgré les récentes acquisitions réalisées dans ce domaine sur la nature chimique de ces pigments, la constitution exacte de la plupart d'entre eux n'est pas encore définitivement établie, lacune qui tient à la fois à la difficulté de telles recherches, à l'absence d'une méthode simple de purification, à la rareté de la matière première et à sa faible teneur en substance colorante.

Les pigments biliaries possèdent de grandes affinités pour les matières protéiques avec lesquelles ils forment des combinaisons dont l'hydrolyse nécessite parfois l'emploi d'agents chimiques énergiques qui, par ailleurs, risquent d'altérer le groupement chromophore très sensible à l'oxydation (chromoprotéides des Algues).

En outre, par leurs fonctions acides, les pigments biliaries se fixent sur les substrats calcaires tels que les coques d'œufs d'Oiseaux, les coquilles des Mollusques, auxquelles nous ajouterons le squelette calcaire d'*Heliopora cærulea*. Ces pigments ne sont cependant pas liés uniquement au calcaire, car, libérés après décalcification par l'acide chlorhydrique aqueux, ils sont insolubles dans les solvants organiques. Ce n'est qu'après

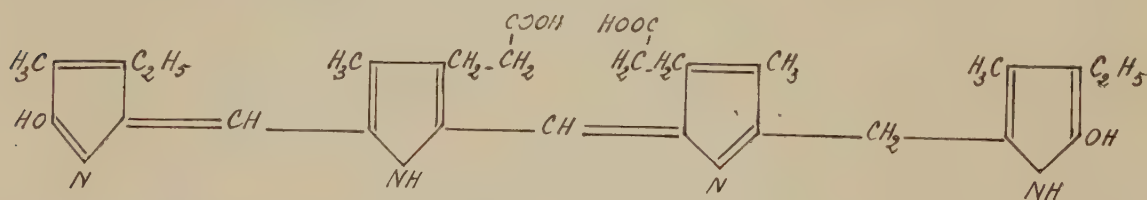
traitement par l'alcool méthylique chlorhydrique que ces pigments dissous et estérifiés peuvent être extraits par le chloroforme. Nous distinguerons donc, dans notre exposé, les pigments biliaires à l'état de chromoprotéides et les bilirubinoïdes liés à des formations calcaires.

I. — Pigments biliaires à l'état de chromoprotéides.

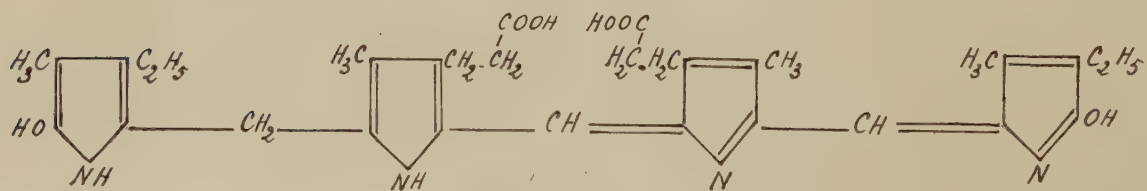
A. — PHYCOCHROMOPROTÉIDES

La pigmentation des Algues bleues (Cyanophycées) et des Algues rouges (Rhodophycées) est due à des chromoprotéides respectivement bleues (phycocyanines) et rouges (phycoérythrine), ces pigments étant le plus souvent associés. Parmi les nombreuses recherches concernant ces pigments, nous ne parlerons que des travaux de R. LEMBERG [21] [22] [23] et de J. ROCHE [24] ayant trait à la nature chimique de leurs groupements prosthétiques. Les phycochromoprotéides que l'on a rapprochés des globulines végétales présentent, en lumière ultra-violette, une fluorescence intense : rouge pour la phycocyanine, orange pour la phycoérythrine. Les caractères spectraux de ces phycochromoprotéides ont été étudiés par CH. DHÉRE et M. FONTAINE [25]. Une solution aqueuse de l'un de ces pigments, additionnée d'un égal volume de soude normale et portée au bain-marie à l'ébullition pendant une heure, perd sa fluorescence propre et présente alors une fluorescence verte comparable à celle de l'urobiline.

Par hydrolyse des phycocyanines et des phycoérythrine à l'aide d'acide chlorhydrique concentré à 80° pendant 20 minutes, en atmosphère d'azote, R. LEMBERG [26] obtient la phycocyanobiline et la phycoérythrobiline, groupements prosthétiques de ces pigments, dont les solubilités sont identiques à celles des bilirubinoïdes. La phycocyanobiline et la phycoérythrobiline, qui par toutes leurs propriétés physiques et chimiques s'apparentent aux pigments biliaires, n'ont cependant pas encore été obtenues à l'état pur et leur constitution chimique n'est pas définitivement établie. Toutefois, traitées par de la potasse alcoolique à 10 % à l'ébullition et en atmosphère d'azote, la phycocyanobiline et la phycoérythrobiline se transforment en glaucobiline [27].



Mésobilivioline IX α.



Mésobilirhodine IX α.

En outre, d'après les couleurs et les spectres des solutions de la phycoeyanobiline et de son sel de zinc à fluorescence rouge, il semble que ce pigment puisse être identifié avec la mésobilivioline de W. SIEDEL [28]. Cet auteur a pu en effet isoler, de la mésobilivioline préparée par H. FISCHER [29], deux produits isomères : l'un, violet en milieu neutre et bleu en milieu acide, pour lequel il a conservé le nom de mésobilivioline, l'autre, rouge en milieu neutre et violet en milieu acide, qu'il a appelé mésobilirhodine. W. SIEDEL pense que la phycoérythrobiline s'apparente à ce dernier pigment.

B. — CHROMOPROTÉIDES DES SÉCRÉTIONS DES APLYSIES

Le pigment violet pourpre des sécrétions d'Aplysies ou limaces de mer (*Aplysia punctata*, *A. depilans*, *A. limacina*) a fait l'objet de nombreuses recherches exposées dans les travaux récents de M. FONTAINE et A. RAFFY [30] et de E. LEDERER [31]. SCHREIBER (1932) [32] a rapproché ce pigment, l'aplysiopurpurine, des pigments biliaires, alors que M. FONTAINE et A. RAFFY (1936), par l'étude de ses spectres d'absorption et de fluorescence, ont montré sa parenté avec la mésobilivioline. Récemment, E. LEDERER (1942) a décelé la présence, dans le jus de sécrétion de l'Aplysie, de deux chromoprotéides, séparables soit par relargage, soit par chromatographie sur alumine. Les groupements prosthétiques de ces chromoprotéides sont facilement dissociés du support protéique, soit par l'alcool butylique, soit simplement par acidification. Les pigments, devenus ainsi solubles dans le chloroforme, peuvent être chromatographiés sur carbonate de calcium et séparés. E. LEDERER a appelé aplysiioviline le pigment violet en solution neutre et bleu en milieu acide, et aplysiorhodine le pigment rouge en solution neutre et violet en milieu acide. Ces deux pigments qui donnent avec l'acétate de zinc des sels complexes bleu et violet possédant une intense fluorescence rouge, ont des propriétés extrêmement voisines de celles de la mésobilivioline, de la pseudo-mésobilivioline et de la mésobilirhodine de W. SIEDEL [33] [34], mais ne peuvent pas toutefois être identifiés avec aucun de ces pigments. Ils présentent également de grandes analogies avec la phycoérythrobiline et la phycocyanobiline. Il semble d'ailleurs que les Aplysies peuvent se nourrir d'Algues dont les chromoprotéides seraient à l'origine des pigments des sécrétions de ces Mollusques marins.

C. — ICTYCHROMOPROTÉIDES

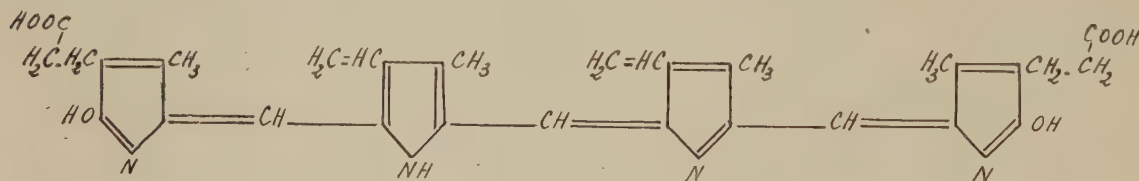
La matière colorante bleue des nageoires de *Crenilabrus pavo* a fait l'objet de nombreuses recherches de VON ZEYNECK [35], dont les résultats ont été ensuite différemment interprétés selon les auteurs. C'est ainsi que R. LEMBERG [36] rapproche ce pigment bleu des phycocromoprotéides. Récemment, M. FONTAINE [37], par l'étude des pigments sériques des Labridés, a mis en évidence la parenté certaine de ce chromoprotéide bleu avec la phycocyanine. En effet, le pigment bleu du sérum de *Labrus bergilla* se comporte comme une globuline, présente une fluorescence rouge en lumière ultra-violette, et possède des spectres d'absorption et de fluorescence entièrement comparables à ceux de la phycocyanine. De plus, une solution aqueuse du pigment, traitée par un volume égal de potasse normale au bain-marie bouillant, perd sa fluorescence rouge et acquiert une fluorescence verte dont le spectre est analogue à celui de l'uro-

biline. En outre, M. FONTAINE a mis en évidence, dans le sérum de *Cyclopterus lumpus*, un chromoprotéide voisin de la phycoérythrine par ses spectres d'absorption et de fluorescence. Cet auteur propose de réunir ces pigments sous le terme d'ichtyochromoprotéides et de nommer les pigments bleus ou bleu-vert des Labridés ichtyocyanines, et le pigment rose du Cycloptère ichtyoérythrine.

Récemment, H. WILLSTAEDT [38] a signalé la présence d'un nouveau chromoprotéide bleu dans les parties vertes de la peau, des nageoires et des arêtes de *Cottus scorpius* (Chaboisseau, Cotte). En outre, cet auteur a montré la parenté de la matière colorante verte des arêtes de *Belone belone* (Orphie) et de *Zoarces viviparus* avec les pigments biliaires. Cette matière colorante, très sensible à l'action des alcalis, devient stable après estérification et peut alors être chromatographiée sur alumine. H. WILLSTAEDT sépare ainsi deux pigments verts qui, en présence de benzidine et d'eau oxygénée, se comportent comme des peroxydases.

D. — CHROMOPROTÉIDES DES AILES DE PAPILLONS

Dans un travail important, M^{me} VON LINDEN [39] a montré la parenté du pigment rouge des écailles de divers Lépidoptères (Vanesses) avec les pigments biliaires. Récemment, H. WIELAND et A. TARTTER [40] ont isolé des ailes de plusieurs espèces de Papillons (*Pteris brassicæ*, *P. rapæ*, *P. napi*, *Gonepteryx rhamni*, *Catopsilia rurina* et *C. statura*); un chromoprotéide bleu, soluble dans l'eau, qui, par hydrolyse acide, donne un pigment biliaire : la ptérobiline, obtenue à l'état cristallisé. Ces auteurs proposent pour ce pigment, présentant tantôt les caractères de la biliverdine, tantôt ceux de la glaucobiline, la formule suivante qui en fait une biliverdine γ :



En effet, de l'hémine peuvent dériver quatre biliverdines suivant que la rupture du cycle porphyrinique a lieu aux ponts α , β , γ ou δ . La biliverdine de la bile est une biliverdine α .

II. — Pigments biliaires liés à des formations calcaires.

A. — BILIVERDINE DES COQUILLES D'ŒUFS D'OISEAUX

Une première bibliographie des recherches entreprises sur les pigments des coquilles d'œufs d'Oiseaux se trouve dans le mémoire de H. FISCHER [41], concernant l'ooporphyrine. Nous ne citerons que les travaux ayant trait au pigment bleu-vert des coquilles classé parmi les pigments biliaires par LIEBERMANN [42], WICKE [43] et SORBY [44]. Reprenant cette étude, LEMBERG [45] réussit à isoler des coquilles d'œufs de Mouettes ce pigment bleu, l'oocyanine, sous forme d'ester méthylique, à la suite d'opérations longues et pénibles effectuées en atmosphère d'azote. L'ester méthylique de l'oocyanine présente les solubilités et les caractères spectroscopiques de l'ester méthylique de la

biliverdine. Avec l'acétate de zinc, il donne un sel complexe vert qui, en présence d'ammoniaque, s'oxyde peu à peu et montre une fluorescence rouge et un spectre d'absorption caractéristique. Dans des recherches ultérieures, R. LEMBERG [46] [47], après avoir préparé les esters méthyliques de la biliverdine et de la mésobiliverdine (glaucobiline de H. FISCHER), compare les propriétés de ces pigments et identifie l'oocyanine avec la biliverdine et l'utéroverdine.

En 1935, D. DINELLI [48] rapproche également le pigment vert des coquilles des œufs d'Emeu de la biliverdine.

B. — PIGMENTS BILIAIRES DES COQUILLES DE MOLLUSQUES

KRÜKENBERG [49], en 1883, signale, pour la première fois, la présence de pigments biliaires dans les coquilles de divers Mollusques appartenant aux genres : *Haliotis*, *Turbo* et *Trochus*, résultat confirmé ultérieurement par les recherches de SCHULZ [50] (1904).

CH. DHÉRE et C. BAUMELER [51] donnent au pigment orange d'*Haliotis rufescens* le nom de rufescine, et en étudient soigneusement les réactions colorées et les spectres d'absorption. Ces auteurs constatent, comme SCHULZ, de grandes analogies entre la rufescine et la bilirubine, appartenant l'une et l'autre à la même phase colorée de la réaction de Gmelin et donnant, par réduction avec l'amalgame de sodium, de l'hydrobilirubine. Cependant, par leurs caractères spectroscopiques, la rufescine et ses produits d'oxydation se distinguent nettement des pigments biliaires de la série bilirubinique.

En 1921, T. KODZUKA [52], par réduction du pigment bleu-vert d'*Haliotis gigantea* à l'aide d'acide iodhydrique et d'iodure de phosphonium, obtient des dérivés pyrroliques.

Après avoir rapproché dans son premier mémoire le pigment bleu-vert d'*Haliotis californiensis* des pigments biliaires, SCHULZ, dans un travail ultérieur [53], le compare à l'indigo. R. LEMBERG [54], reprenant cette étude, réfute cette seconde hypothèse et réussit enfin, en traitant la poudre des coquilles par de l'alcool absolu chlorydrique, à obtenir un produit présentant les solubilités des esters méthyliques des pigments biliaires. Cet auteur put ainsi séparer, grâce à leurs solubilités différentes dans l'acide chlorhydrique dilué, deux pigments qui, en solution chloroformique acide, sont vert (pigment A) ou bleu-vert (pigment B).

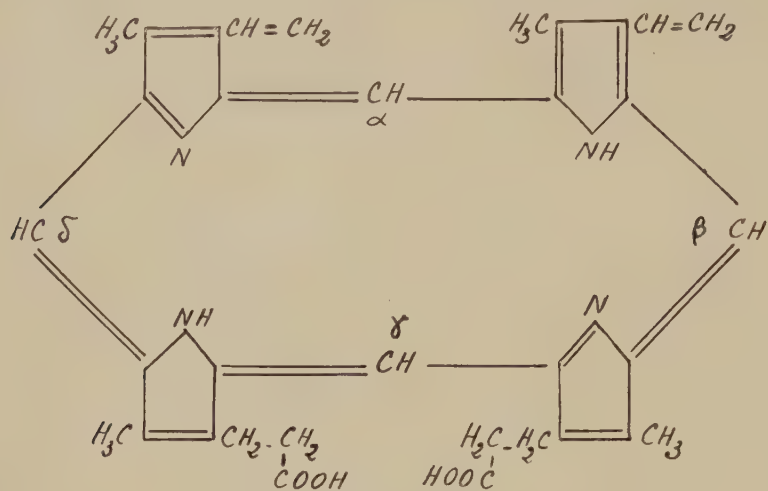
A ce groupe de bilirubinoïdes appartient également le pigment tégumentaire d'*Arion rufus* que L. DOR [55] considère comme un carbonate d'urobiline, tandis que CH. DHÉRE et ses collaborateurs [56] [57] le comparent à la bilirubine et le nomment rufine.

Ainsi, bien que la parenté de ces pigments des coquilles de Mollusques avec les bilirubinoïdes soit certaine, leur constitution chimique exacte est totalement inconnue, aucun d'entre eux n'ayant été obtenu à l'état cristallisé. Leur origine, également obscure, a permis à CH. DHÉRE de supposer leur formation aux dépens des cytochromes.

B. — ESTER MÉTHYLIQUE DE LA BILIVERDINE IX α

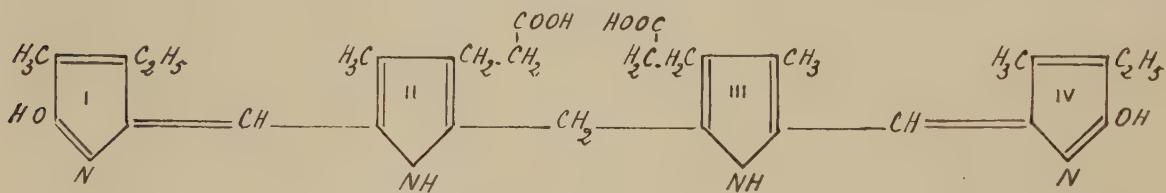
La nomenclature employée pour désigner les pigments biliaires doit tenir compte des porphyrines qui correspondent à ces bilirubinoïdes. C'est ainsi qu'il existe quinze isomères possibles de la protoporphyrine, numérotés de I à XV, distincts les uns des autres par les positions respectives des radicaux méthyle, vinyle et acide propionique des noyaux pyrroliques.

Les pigments biliaries naturels dérivant de la protoporphyrine IX seront affectés du chiffre IX. En outre, il est nécessaire de tenir compte de l'endroit où se produit la rupture du cycle porphyrinique; cette ouverture peut avoir lieu aux ponts α , β , γ ou δ . Les bilirubinoïdes du type IX, dérivant de la protoporphyrine par rupture du cycle porphyrinique au pont α , seront affectés du signe IX α .



Protoporphyrine IX.

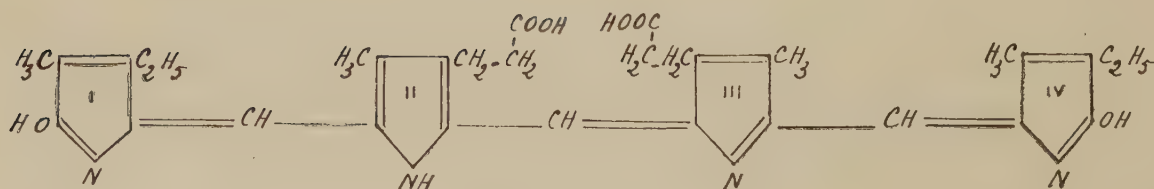
binoïdes du type IX, dérivant de la protoporphyrine par rupture du cycle porphyrinique au pont α , seront affectés du signe IX α .



Mésobilirubine IX α .



Ferrobiline IX α .

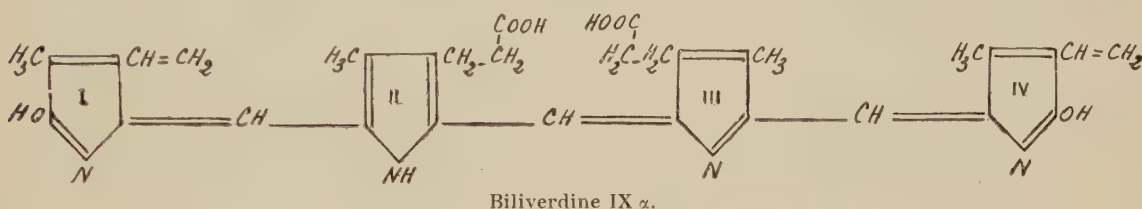


Glaucobiline IX α .

Par action du perchlorure de fer sur la mésobilirubine IX α en présence d'acide acétique, H. FISCHER, H. BAUMGARTNER et R. HESS [58] ont obtenu un produit cristallisé : la ferrobiline, combinaison moléculaire répondant à la formule : $C_{33}H_{38}O_6N_4FeCl_3$. Ce produit, traité par la lessive de soude, donne un pigment bleu : la glaucobiline IX α , de formule $C_{33}H_{38}O_6N_4$. En outre, ce pigment a été obtenu par oxydation de la mésobilirubine avec l'acide sulfurique concentré, la quinone et le bioxyde de plomb. L'hypothèse selon laquelle la glaucobiline se formait par déshydrogénation de la mésobilirubine a été confirmée par la synthèse totale de ces pigments réalisée par W. SIEDEL [59]. Par suite, le passage de la mésobilirubine à la glaucobiline a lieu selon le schéma figuré au bas de la page 366.

L'enlèvement de deux atomes d'hydrogène : l'un à l'azote du noyau pyrrolique III, l'autre au pont $—CH_2—$, provoque la formation d'une nouvelle double liaison.

La déshydrogénation de la bilirubine conduit à un produit de constitution analogue, la biliverdine, qui diffère de la glaucobiline par la présence de fonctions vinyle sur les noyaux I et IV à la place des radicaux éthyle.



La biliverdine, en tant que produit secondaire, a été obtenue à l'état cristallisé, pour la première fois, par W. KÜSTER [60], dans la préparation de la bilirubine à partir des calculs biliaires. En 1940, H. FISCHER et H. REINECKE [61] ont préparé la biliverdine IX α en oxydant la bilirubine à l'aide de quinone et en passant par une ferrobiline cristallisée, décomposée ultérieurement par la lessive de soude. La synthèse de ce pigment a été faite, en 1942, par H. FISCHER et H. PLIENINGER [62].

Dans le procédé que nous avons utilisé, la bilirubine est oxydée à l'aide de quinone et la biliverdine formée est, après estérification, purifiée par chromatographie, ce qui élimine le stade ferrobiline.

A. — PRÉPARATION

1° OXYDATION DE LA BILIRUBINE IX α . — La bilirubine naturelle employée nous a été fournie par la maison Hoffman la Roche.

300 mgr. de bilirubine mis en suspension dans 15 cc. d'acide acétique, et additionnés de 300 mgr. de quinone, sont portés au bain-marie bouillant pendant une demi-heure environ. Au fur et à mesure de sa formation, la biliverdine se dissout dans l'acide acétique et la liqueur devient rapidement vert foncé. La bilirubine non oxydée est séparée par filtration, puis remise en suspension dans l'acide acétique et oxydée à l'aide de quinone au bain-marie bouillant. Cette opération est renouvelée jusqu'à ce que toute la bilirubine soit transformée en biliverdine. Les diverses solutions acétiques vertes recueillies sont réunies, puis évaporées à sec, sous une cloche à vide, en présence de chaux éteinte.

2° ESTÉRIFICATION. — Après concentration de la liqueur acétique verte, H. FISCHER sépare la biliverdine sous forme de ferrobiline cristallisée, décompose ce complexe à l'aide d'une lessive alcaline et estérifie la biliverdine ainsi obtenue à l'aide de diazo-méthane [63].

Evitant le stade ferrobiline, nous avons estérifié directement la biliverdine formée. Pour cela, nous avons dissous les produits d'évaporation de la solution acétique dans 50 cc. d'alcool méthylique chlorhydrique, renfermant 8 gr. de gaz chlorhydrique pour 100 cc. d'alcool; la solution vert foncé obtenue est abandonnée six heures environ à l'obscurité, afin d'éviter l'altération des pigments sensibles à l'oxygène de l'air et à la lumière. La solution alcoolique acide est alors additionnée de 50 cc. de chloroforme et de 25 cc. d'eau distillée, puis la couche chloroformique contenant l'ester méthylique de la biliverdine est séparée par décantation de la solution aqueuse légèrement colorée par des dérivés de la quinone.

Après plusieurs lavages à l'eau distillée, la liqueur chloroformique bleu-vert est traitée, à deux reprises, par 25 cc. d'une solution de soude N/5 qui entraîne la bilirubine non oxydée et non estérifiée, puis la liqueur est de nouveau lavée plusieurs fois à l'eau distillée. Après passage sur un filtre sec, la solution chloroformique est finalement déshydratée à l'aide de sulfate de sodium anhydre.

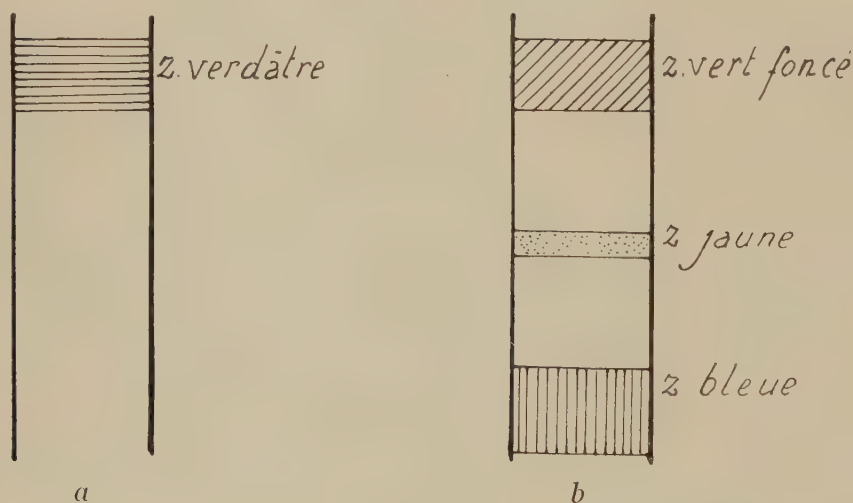


FIG. 5.

3° CHROMATOGRAPHIE. — M. le professeur SANNIÉ a mis à notre disposition un appareillage de chromatographie nous permettant d'opérer sous pression et en atmosphère, d'azote, afin d'éviter l'altération des pigments par l'oxygène de l'air.

Après filtration, la solution est concentrée à 15 cc. environ en opérant à la plus basse température possible. Pour cela, la solution est versée dans un ballon muni d'une part d'un tube capillaire et relié d'autre part à une trompe à eau, afin de faire le vide dans l'appareil. La solution concentrée est, après addition d'un égal volume d'éther anhydre, filtrée sur une colonne d'alumine (hauteur : 20 cm.; diamètre : 1,2 cm.) qui fixe les pigments dans sa portion supérieure (fig. 5, a).

En substituant au mélange éther-chloroforme du chloroforme pur, une zone bleue correspondant à l'ester méthylique de la biliverdine se détache de la zone colorée supérieure (fig. 5, b), puis descend rapidement le long de la colonne d'alumine. Au sommet

de la colonne demeure une zone verte, alors qu'un pigment jaune correspondant à l'ester méthylique de la bilirubine non oxydée s'étale dans toute la colonne. La zone verte qui reste à la partie supérieure de la colonne et la zone bleue qui se détache semblent d'égale importance.

La solution chloroformique bleue, qui a filtré à travers la colonne d'alumine, donne par évaporation un produit cristallisé en aiguilles bleu foncé, réunies en houppes.

Bien que parfaitement cristallisé, le produit ainsi préparé contient encore un peu de pigment jaune qu'une seconde chromatographie permet d'éliminer totalement. Dans cette nouvelle opération, nous remplaçons le chloroforme par l'acétate d'éthyle (15 cc.) et nous additionnons la solution pigmentaire ainsi obtenue de 4 volumes d'éther. Ce mélange est filtré sur la colonne d'alumine qui retient les pigments dans sa portion supérieure. De cette zone supérieure, à l'aide d'un mélange d'éther et d'acétate d'éthyle à volumes égaux, nous détachons le pigment bleu qui descend en une zone bleue nettement délimitée, alors que le pigment jaune reste fixé en haut de la colonne d'alumine. Par concentration de la solution bleue qui a ainsi filtré à travers la colonne, l'ester méthylique de la biliverdine cristallise en prismes bleus réunis en houppes ou en oursins; nous recueillons ces cristaux sur un petit filtre par essorage et nous les lavons à l'éther. Une dernière chromatographie montre l'homogénéité du pigment ainsi purifié.

Cette méthode de préparation nous a permis d'obtenir 130 mgr. environ d'ester méthylique de la biliverdine IX α . Le rendement en biliverdine est diminué par la présence d'une petite quantité de bilirubine non oxydée, et surtout par la formation d'un pigment vert dont nous n'avons pu élucider la nature.

B. — PROPRIÉTÉS

L'ester méthylique de la biliverdine IX α ainsi préparé fond au bloc de Maquenne à 216°-217°. L'analyse élémentaire (C, H) s'accorde avec la formule brute : $C_{35}H_{38}O_6N_4$.

Prise d'essai en mgr.	H ₂ O en mgr.	CO ₂ en mgr.
3,629	2,036	9,159
	H %	C %
Trouvé	6,25	68,87
Calculé	6,22	68,85

L'ester méthylique de la biliverdine est très soluble dans le chloroforme, moins soluble dans l'acétate d'éthyle et l'alcool méthylique, peu soluble dans l'éther, insoluble dans le sulfure de carbone et l'éther de pétrole.

Les autres propriétés de la biliverdine étant exposées en même temps que celles du pigment d'*Heliopora*, nous n'indiquerons ici que les résultats fournis par l'étude des spectres d'absorption dans l'ultra-violet et dans le visible.

SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET. — L'examen du spectre d'absorption dans l'ultra-violet des solutions de l'ester méthylique de la biliverdine n'ayant pas encore été entrepris, nous avons réalisé cette étude à l'aide du grand spectrographe pour chimistes de Zeiss à optique de quartz, avec un dispositif photométrique à secteur tournant [64]. La source utilisée est un tube à hydrogène système Challenge.

Nous avons examiné une solution chloroformique du pigment à la concentration

M/10.000, soit 6,10 mgr. de l'esther méthylique de la biliverdine pour 100 cc. de chloroforme. Les positions des maxima des bandes d'absorption, précisées par l'enregistrement à l'aide du microphotomètre de Sannié, et les coefficients d'extinction moléculaire ($\log. \epsilon \text{ mol.}$) sont indiqués dans le tableau suivant :

Esters méthyliques	Max. I		Max. II		Max. III	
	$\lambda \text{ m}\mu$	$\log. \epsilon \text{ mol.}$	$\lambda \text{ m}\mu$	$\log. \epsilon \text{ mol.}$	$\lambda \text{ m}\mu$	$\log. \epsilon \text{ mol.}$
Biliverdine	384	4,72	316	4,38	282	4,29
Glaucobiline	363	4,67	315	4,39	286	4,25
Ptérobiline	363	4,72	324	4,46	286	4,27

Le coefficient d'extinction moléculaire $\epsilon \text{ mol.}$ est calculé d'après la formule :

$$\epsilon = \frac{1}{cd} \cdot \log. \frac{I_0}{I}$$
 c étant la concentration molaire de la solution, d l'épaisseur de la cuve, I_0 l'intensité du flux lumineux à son entrée dans la solution, et I l'intensité de ce même flux à sa sortie de la solution.

En outre, dans ce tableau, sont données, à titre comparatif, les mesures spectrophotométriques de la glaucobiline [65] et de la ptérobiline [66].

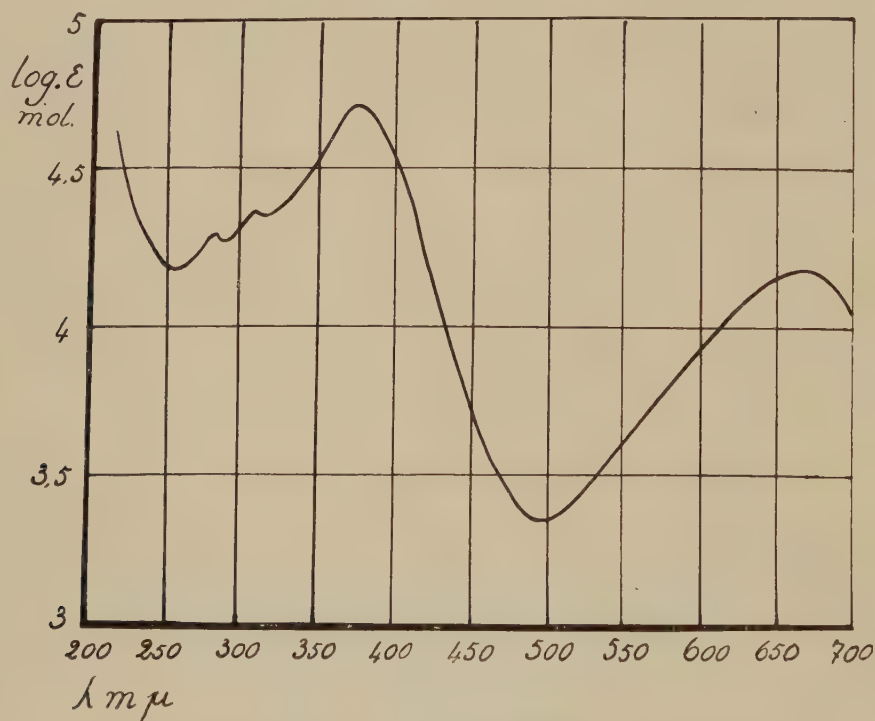


FIG. 6. — Courbes d'absorption de l'esther méthylique de la biliverdine dans l'ultra-violet et le visible.

La courbe d'absorption de l'esther méthylique de la biliverdine (fig. 6) présente, d'une part, une bande d'absorption principale dont le maximum (I) se situe à λ 384 $\text{m}\mu$, et, d'autre part, deux bandes secondaires dont les maxima (II et III) se trouvent respectivement à λ 316 $\text{m}\mu$ et à λ 282 $\text{m}\mu$. L'intensité de l'absorption dans l'ultra-violet de ces trois bandes décroît régulièrement de I à III.

L'allure générale de la courbe d'absorption de l'ester méthylique de la biliverdine est entièrement comparable à celle des courbes d'absorption des esters méthyliques de la glaucobiline et de la ptérobiline dans le dioxane, courbes qui montrent également, à côté d'une bande d'absorption principale, deux maxima secondaires (fig. 7).

Remarquons cependant que le maximum I des bandes principales de la glaucobiline et de la ptérobiline se situe à λ 363 $m\mu$ (décalage de près de 20 $m\mu$ vers les courtes longueurs d'ondes par rapport au maximum I de la biliverdine), alors que les positions des maxima II et III sont voisines dans les trois cas. Or, ce décalage du maximum I ne peut être imputé à l'emploi du chloroforme, car une étude du spectre d'absorption de l'ester

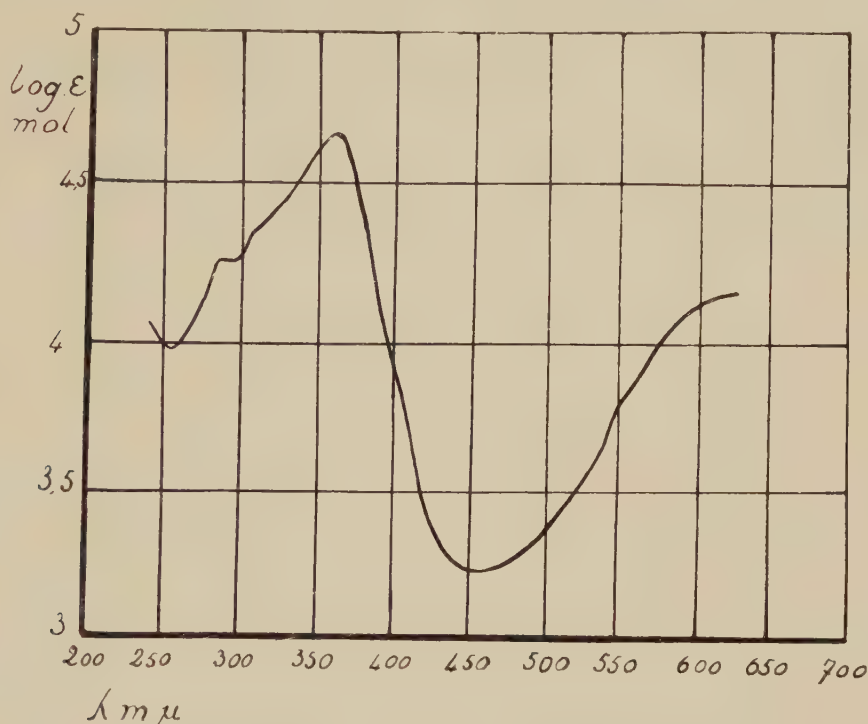
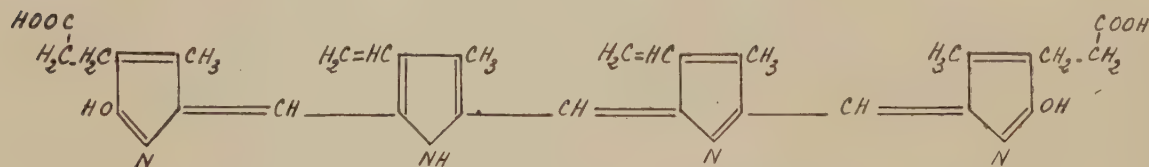


FIG. 7. — Courbes d'absorption de l'ester méthylique de la glaucobiline dans l'ultra-violet et le visible (d'après STERN et PRUCKNER).

méthylique de la biliverdine dans le dioxane nous a donné des résultats absolument identiques. Nous devons attribuer le décalage important de la bande principale d'absorption vers les grandes longueurs d'ondes à la présence des groupes vinyle dans la molécule de la biliverdine. Rappelons, en effet, que la biliverdine diffère uniquement de la glaucobiline par l'existence de deux groupements vinyle substitués aux deux radicaux éthyle de cette dernière. Des constatations analogues seront également envisagées lors de l'étude des spectres d'absorption dans le visible. Par contre, les positions des maxima II et III des esters méthyliques de la biliverdine et de la glaucobiline ne sont pas influencées par la présence des radicaux vinyle ou éthyle, mais semblent dépendre des groupements azotés des noyaux pyrroliques. En effet, la formation du chlorhydrate de l'ester méthylique de la biliverdine ne modifie pas la position du maximum I, mais provoque le déplacement des maxima II et III vers les courtes longueurs d'ondes; le maximum II se situe dans ce cas à λ 306 $m\mu$, et le maximum III à λ 271 $m\mu$.

La ptérobiline, pigment bleu isolé des ailes de Piérides par H. WIELAND et A. TARTTER [67], possède des propriétés analogues tantôt à celles de la biliverdine, tantôt à celles de la glaucobiline. C'est ainsi que le maximum des bandes principales d'absorption des sels complexes de zinc de la biliverdine et de la glaucobiline, après addition d'iode, se situent respectivement à λ 642 m μ pour la biliverdine et à λ 627 m μ pour la glaucobiline. Ainsi, dans le visible comme dans l'ultra-violet, la présence de groupes vinyle provoque un déplacement important des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'ondes. La position de la bande principale d'absorption du sel complexe de zinc de la ptérobiline, après addition d'iode, étant identique à celle du sel de zinc de la biliverdine (λ 641 m μ), il était donc logique de penser à la présence de groupe vinyle dans la molécule de la ptérobiline. Or, ces résultats sont en opposition avec ceux fournis par l'étude comparative des spectres d'absorption de la biliverdine, de la glaucobiline et de la ptérobiline dans l'ultra-violet. En effet, le spectre d'absorption de la ptérobiline dans l'ultra-violet diffère nettement de celui de la biliverdine par la position du maximum I (λ 363 m μ , au lieu de λ 384 m μ). Il semble donc difficile de conclure actuellement à la présence de radicaux vinyle ou éthyle dans la ptérobiline, bien que H. WIELAND et A. TARTTER aient proposé pour ce bilirubinoïde la formule suivante, qui en fait une biliverdine γ :



SPECTRES D'ABSORPTION DANS LE VISIBLE. — a) *Solution neutre* : N'ayant pas trouvé d'indications précises concernant le spectre d'absorption dans le visible des solutions de l'ester méthylique de la biliverdine, nous avons entrepris cette étude à l'aide du spectrophotomètre de G. Yvon et A. Jobin, qui nous permet de déterminer la densité optique δ des solutions examinées ($\delta = \log. \frac{I_0}{I}$). Le coefficient d'extinction moléculaire ϵ mol. est calculé d'après la formule : $\epsilon \text{ mol.} = \frac{1}{cd} \delta$, c étant la concentration molaire de la solution examinée, d l'épaisseur de la cuve.

Dans l'appareil, l'épaisseur de la cuve étant de 1 cm., la formule devient $\epsilon \text{ mol.} = \frac{1}{c} \delta$, et $\log. \epsilon \text{ mol.} = \log. \frac{\delta}{c}$. La densité optique de la solution chloroformique bleue de la biliverdine croît à partir d'un minimum qui se situe vers λ 490 m μ ($\log. \epsilon \text{ mol.} = 3,34$), passe par un maximum vers λ 665 m μ ($\log. \epsilon \text{ mol.} = 4,20$), puis décroît lentement (fig. 6). La courbe représentée a été obtenue avec la solution M/10.000, qui nous a également servi pour déterminer le spectre d'absorption dans l'ultra-violet. Une courbe identique a été tracée avec l'ester méthylique de la biliverdine en solution dans le dioxane.

Les maxima d'absorption des solutions neutres de la glaucobiline et de la ptérobiline dans le dioxane se situent, pour ces deux pigments, à λ 640 m μ , soit un décalage de 25 m μ par rapport au maximum de la biliverdine.

b) *Solution acide* : La densité optique de la solution chloroformique acide bleu-vert, obtenue en ajoutant 2 gouttes d'alcool méthylique chlorhydrique à la solution précédente, croît à partir d'un minimum qui se situe vers λ 492 m μ et passe par un maximum à λ 675 m μ .

(fig. 8). Cette solution, ayant une absorption plus grande que la solution neutre, a dû être diluée de moitié. Ne connaissant pas la concentration exacte de la solution acide, nous avons calculé le coefficient d'extinction ϵ (non moléculaire) d'après la formule $\log. \epsilon = \log. \epsilon_0$.

c) *Sel complexe de zinc* : L'addition de quelques gouttes d'une solution alcoolique d'acétate de zinc à 1 % à 10 cc. de solution chloroformique neutre de l'ester méthylique de la biliverdine M/10.000 provoque le virage du bleu au vert par suite de la formation d'un sel complexe. La densité optique de la solution croît régulièrement du violet au

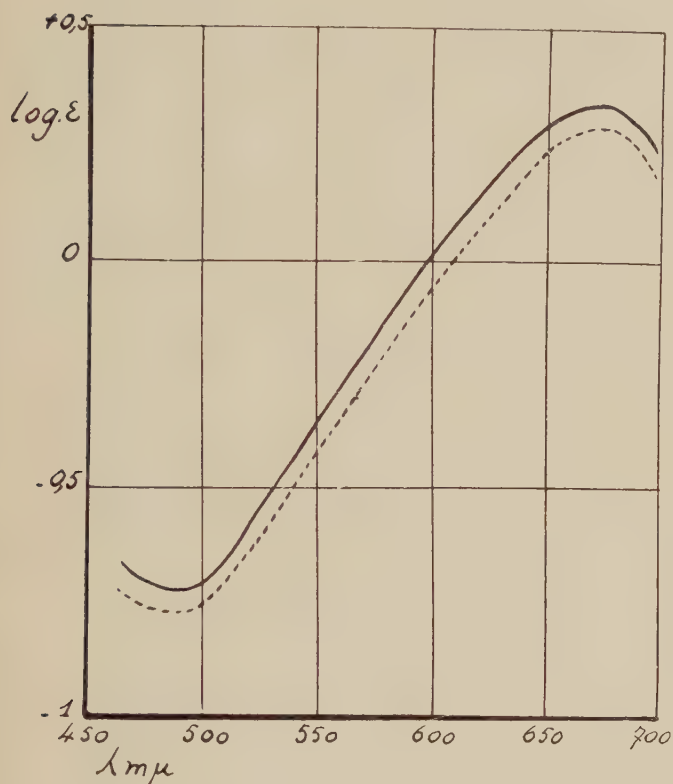


FIG. 8.

FIG. 8. — Courbes d'absorption des solutions acides des esters méthyliques de la biliverdine IX α (—) et de la biliverdine des coquilles d'œufs d'Emeu (.....).

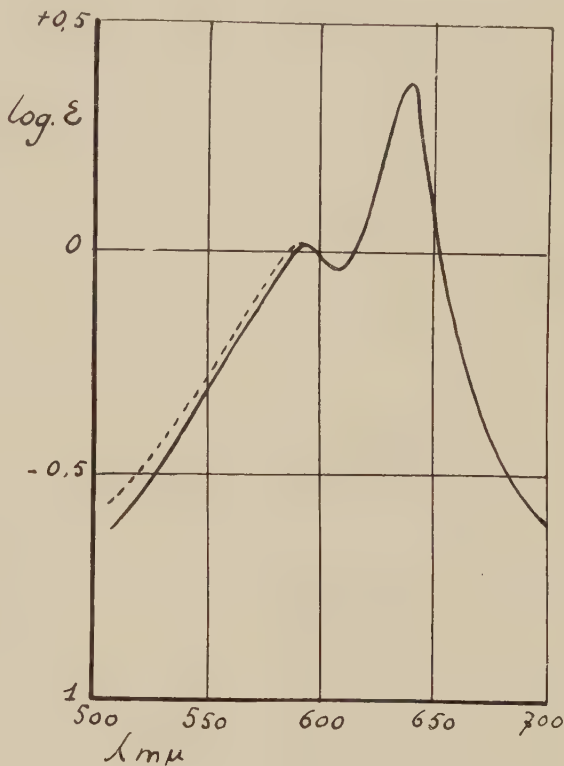


FIG. 9.

FIG. 9. — Courbes d'absorption des sels de zinc oxydés par l'iode de la biliverdine IX α (—) et de la biliverdine des coquilles d'œufs d'Emeu (.....).

rouge, sans qu'il soit possible de décélérer au spectrophotomètre un maximum dans le visible. R. LEMBERG [68] a cependant signalé la présence dans l'extrême rouge d'une bande d'absorption d'axe λ 685 m μ .

Par contre, après addition de quelques gouttes d'une solution alcoolique d'iode à 1 %, la liqueur devient rapidement bleue et présente alors une intense fluorescence rouge et un spectre à deux bandes d'absorption caractéristiques : l'une, principale, à λ 640 m μ ; l'autre, plus faible, à λ 590 m μ (fig. 9). La courbe d'absorption est calculée en $\log. \epsilon$ (non moléculaire). Le maximum de la bande principale d'absorption du sel complexe de zinc de la glaucobiline, après addition d'iode, se situe à λ 627 m μ .

C. — CONCLUSION

La préparation de l'ester méthylique de la biliverdine est simplifiée par l'emploi de la méthode chromatographique qui permet une purification facile de ce pigment. Nous pensons que cette méthode appliquée à l'étude des biliverdines naturelles en facilitera l'isolement, malaisé par voie chimique.

Le spectre dans l'ultra-violet de l'ester méthylique de la biliverdine permet de différencier ce pigment des esters méthyliques de la glaucobiline et de la ptérobiline. En effet, si l'allure générale des courbes d'absorption est analogue pour ces trois bilirubinoïdes, les maxima des bandes principales diffèrent; celui de l'ester méthylique de la biliverdine est décalé vers les grandes longueurs d'ondes par rapport à ceux des deux autres pigments biliaries.

Enfin, les spectres d'absorption de l'ester méthylique de la biliverdine dans le visible ont été précisés, afin d'être comparés à ceux de l'ester méthylique du pigment des coquilles d'œufs d'Emeu.

C. — ESTER MÉTHYLIQUE DE LA BILIVERDINE
DES COQUILLES D'ŒUFS D'ÉMEU
(DROMICEIUS NOVÆ HOLLANDIÆ [LATHAM])

Les coquilles d'œufs d'Emeu (Oiseau Ratite de l'ordre des Casuariformes) sont granuleuses; elles présentent une coloration tantôt vert jaunâtre, tantôt vert foncé presque noir, et mesurent 12 à 15 cm. de long et 8 à 9 cm. de large.

La matière colorante de ces coquilles a été étudiée pour la première fois par D. DINELLI, en 1935 [69]. Bien que cet auteur n'ait pas spécifié le genre auquel appartenaient les œufs examinés, nous pensons qu'il s'agit d'œufs d'Emeu (genre *Dromiceius*) à coquille vert foncé, et non d'œufs de Casoar (genre *Casuaris*) à coquille peu colorée en jaune verdâtre.

D. DINELLI, concluant à la parenté de la matière colorante verte avec la biliverdine, constate que celle-ci, après destruction du substrat calcaire, existe sous deux formes : la première donne, avec l'alcool méthylique chlorhydrique, un ester soluble dans le chloroforme (ester obtenu partiellement cristallisé); la seconde, insoluble dans l'alcool, reste fixée sur des résidus de substance organique. Sous cette dernière forme, le pigment, extrait par une solution alcaline à l'ébullition et précipité par acidification, serait un chromoprotéide. Cependant, les seules preuves invoquées par D. DINELLI, pour identifier le pigment des coquilles d'œufs d'Emeu avec la biliverdine, sont la réaction de Gmelin et le spectre de la solution neutre de l'ester méthylique comportant une bande d'absorption vers λ 650 m μ . Aussi, ayant à notre disposition trois coquilles d'œufs d'Emeu, avons-nous repris le travail de DINELLI, afin de simplifier la purification de cette biliverdine par l'emploi de la méthode chromatographique, de préciser sa parenté avec la biliverdine IX α , et de comparer ses propriétés avec celles du pigment d'*Heliopora*.

Alors que D. DINELLI a essayé de purifier le pigment des coquilles d'œufs d'Emeu par voie chimique et n'a pu obtenir, malgré de nombreuses manipulations, qu'un produit impur, partiellement cristallisé, s'altérant dès 100°, nous avons substitué à cette méthode l'analyse chromatographique qui a permis une purification rapide de ce pigment.

A. — PRÉPARATION

1° DÉCALCIFICATION ET ESTÉRIFICATION. — Trois coquilles vert foncé (240 gr.) d'œufs d'Emeu (1), écrasées en menus fragments, sont attaquées par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 10 % (environ 2 litres), jusqu'à destruction totale de la substance calcaire. La matière colorante insoluble est ensuite séparée de la solution aqueuse des sels de calcium par filtration sur un entonnoir Büchner. Les résidus pigmentés, recueillis sur le filtre, sont séchés dans le vide en présence d'acide sulfurique pendant une nuit, puis traités par environ 100 cc. d'alcool méthylique chlorhydrique à 14 %, qui dissout et estérifie la plus grande partie de la matière colorante. Une certaine quantité de pigment reste en effet fixée sur des résidus de substance organique et ne peut être extraite par ce procédé. La solution alcoolique acide bleu-vert, abandonnée six heures à l'obscurité pour éviter l'altération du pigment, est alors séparée des résidus organiques par décantation, puis filtrée sur du coton hydrophile. Ces résidus organiques encore pigmentés sont de nouveau traités par 100 cc. d'alcool méthylique chlorhydrique, qui ne dissolvent plus que des traces de pigment. Les solutions alcooliques réunies sont additionnées de 200 cc. de chloroforme, puis de 200 cc. d'eau distillée. La couche chloroformique bleue contenant l'ester méthylique du pigment est séparée, lavée plusieurs fois à l'eau distillée pour éliminer l'acide et les sels calcaires, puis traitée à deux reprises par 60 cc. d'une solution de carbonate de sodium à 10 %, et lavée de nouveau à l'eau distillée. La solution chloroformique bleue ainsi obtenue est desséchée avec du sulfate de sodium anhydre, puis filtrée sur un filtre sec.

2° PURIFICATION DU PIGMENT PAR CHROMATOGRAPHIE. — Le mode opératoire est celui que nous avons utilisé antérieurement pour l'ester méthylique de la biliverdine.

La solution chloroformique, concentrée dans le vide à quelques cc., puis additionnée de deux fois son volume d'éther anhydre, est filtrée sur une colonne d'alumine activée fixant les pigments dans sa partie supérieure (fig. 10, *a*). A l'aide de chloroforme, nous détachons une zone bleue, puis une zone jaune, qui descendent le long de la colonne; à la partie supérieure de la colonne demeure une couche gris verdâtre (fig. 10, *b*). Lorsque la zone bleue est nettement séparée, la colonne d'alumine est sortie du tube à chromatographe, la zone bleue découpée et le pigment élué avec de l'acétate d'éthyle.

La nouvelle solution bleue obtenue, concentrée dans le vide à quelques cc., est additionnée de quatre volumes d'éther anhydre, puis filtrée sur une colonne d'alumine pour éliminer les traces de pigment jaune. Avec un mélange à parties égales d'acétate d'éthyle et d'éther, nous détachons le pigment bleu qui descend le long de la colonne et filtre. La solution bleue ainsi obtenue, soumise à une dernière chromatographie, se montre parfaitement homogène.

Par évaporation de cette solution, le pigment cristallise en prismes bleus, généralement réunis en houppes ou en oursins, aspect cristallin comparable à celui de l'ester méthylique de la biliverdine IX α .

Le pigment bleu est dissous dans la plus petite quantité possible de chloroforme,

(1) Les coquilles d'œufs d'Emeu nous ont été données par le laboratoire de Mammalogie et d'Ornithologie du Muséum. Nous adressons nos très vifs remerciements à Monsieur le professeur BOURDELLE, ainsi qu'à Messieurs BERLIOZ et RODE.

et la solution obtenue additionnée de 5 cc. d'alcool méthylique bouillant. Par refroidissement, le pigment cristallise en prismes bleus réunis en rosettes. Ces cristaux, recueillis par centrifugation, sont finalement desséchés dans le vide, en présence d'acide sulfurique. A partir de trois coquilles, nous avons ainsi isolé 16 mgr. de pigment sous forme d'ester méthylique.

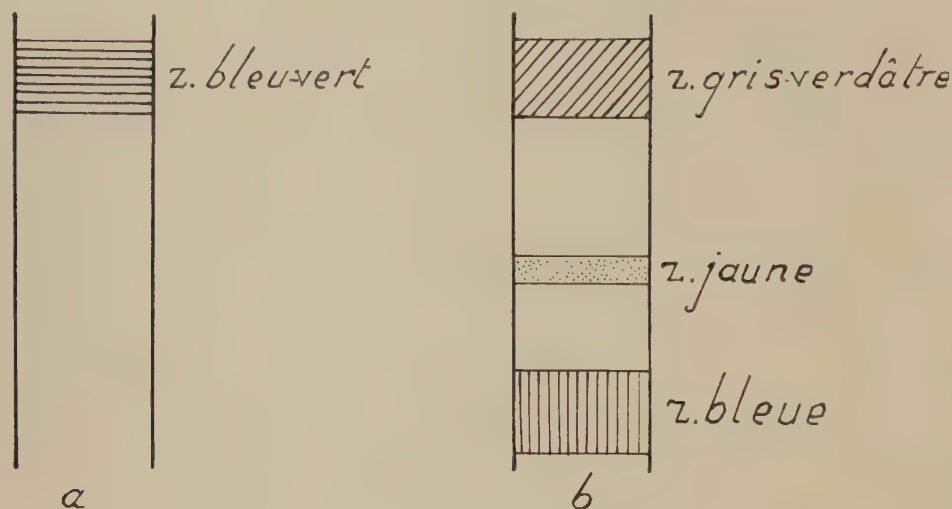


FIG. 10.

B. — PROPRIÉTÉS

Ce pigment est soluble dans le chloroforme et l'acétate d'éthyle, peu soluble dans l'alcool méthylique et l'éther, insoluble dans le sulfure de carbone et l'éther de pétrole.

Son point de fusion pris au bloc de Maquenne est de 217°-218°. Nous avons en outre pris simultanément les points de fusion des esters méthyliques du pigment bleu des coquilles d'œufs d'Emeu et de la biliverdine IX α , ainsi que celui d'un mélange de ces deux pigments, ces trois substances étant placées chaque fois dans le même plan en suivant la ligne médiane longitudinale du bloc de Maquenne. Ces trois produits ont fondu simultanément entre 216° et 218°. Pris au tube capillaire, le point de fusion de l'ester méthylique de la biliverdine des coquilles d'œufs d'Emeu est de 211°-212°, celui du mélange de ce pigment et de l'ester méthylique de la biliverdine IX α est de 210°-211°. Les points de fusion des esters méthyliques du pigment bleu des coquilles d'œufs d'Emeu et de la biliverdine IX α sont donc analogues, et le mélange de ces deux pigments ne montre aucun abaissement du point de fusion; cette expérience est en faveur de l'identité des deux produits.

Par suite de la faible quantité de pigment à notre disposition, nous n'avons effectué qu'un seul dosage d'azote selon la microméthode de Kjeldhal, le produit ayant été au préalable desséché à 115°.

Prise d'essai en mgr.	N en mgr.	N %
4,548	0,398	8,75

La teneur en azote de l'ester méthylique de la biliverdine IX α est de 9,17 %.

RÉACTION DE GMELIN. — La solution chloroformique du pigment donne avec l'acide nitrique nitreux les phases violette, rouge, orange et jaune de la réaction de Gmelin.

CHROMATOGRAPHIE MIXTE. — Des solutions (de concentration identique au spectrophotomètre) de l'ester méthylique de la biliverdine IX α et du pigment des coquilles d'œufs d'Emeu dans l'acétate d'éthyle mélangées à volumes égaux, sont additionnées de quatre volumes d'éther anhydre. Ce mélange est filtré sur une colonne d'alumine qui retient les pigments dans la portion supérieure, puis le chromatogramme est développé à l'aide d'un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther à volumes égaux. Les deux pigments descendent le long de la colonne en une seule zone bleue parfaitement délimitée. Selon toute vraisemblance, si ces deux pigments étaient différents, nous aurions dû pouvoir les séparer par chromatographie. En effet, cette épreuve, généralement employée pour établir l'identité ou la dissemblance de deux pigments, est comparable, d'après L. ZECHMEISTER et L. VON CHOLNOKY [70], au point de fusion mixte. Par évaporation, la solution bleue recueillie au bas de la colonne ne donne qu'une seule forme cristalline : prismes bleus réunis en oursins.

SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET. — La technique employée est semblable à celle que nous avons indiquée pour l'ester méthylique de la biliverdine. Nous avons

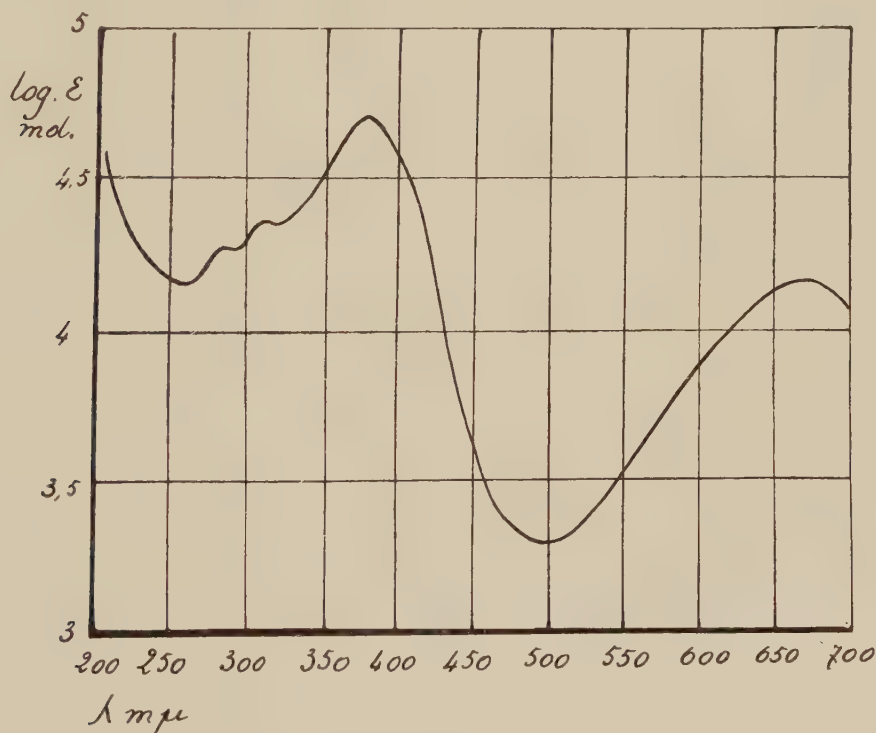


FIG. 11. — Courbes d'absorption de l'ester méthylique de la biliverdine des coquilles d'œufs d'Emeu dans l'ultra-violet et le visible.

examiné une solution chloroformique du pigment des coquilles d'œufs d'Emeu, dont la concentration était identique à celle de la solution précédemment étudiée de l'ester méthylique de la biliverdine, soit 6,10 mgr. de pigment pour 100 cc. de chloroforme

(solution $\frac{M}{10.000}$). Les courbes d'absorption de ces deux pigments calculées en $\log. \epsilon$ mol. sont superposables ; les positions des maxima et des minima précisées par l'enregistrement à l'aide du microphotomètre de Sannié, et les coefficients d'extinction moléculaires ($\log. \epsilon$ mol.), sont identiques.

La courbe d'absorption (fig. 11) de l'ester méthylique du pigment bleu des coquilles d'œufs d'Emeu indique, en effet, une bande principale dont le maximum I se situe à λ 384 m μ ($\log. \epsilon$ mol. = 4,72), et deux bandes secondaires dont les maxima II et III sont respectivement à λ 316 m μ ($\log. \epsilon$ mol. = 4,38) et λ 283 m μ ($\log. \epsilon$ mol. = 4,29) ; l'intensité de l'absorption décroît de I à III. Les positions des maxima et des minima sont données dans le tableau suivant :

Esters méthyliques	Maxima en λ m μ			Minima en λ m μ		
	I	II	III	I	II	III
Biliverdine IX α	384	316	282	330,5	293	263
Biliverdine des œufs d'Emeu..	384	316	283	330,5	293,5	263

SPECTRES D'ABSORPTION DANS LE VISIBLE. — a) *Solution neutre* : La solution chloroformique précédente, examinée au spectrophotomètre de G. Yvon et A. Jobin, montre un minimum d'absorption à λ 490 m μ ($\log. \epsilon$ mol. = 3,28), et un maximum d'absorption à λ 665 m μ ($\log. \epsilon$ mol. = 4,20) (fig. 11). Les courbes d'absorption des solutions chloroformiques neutres de concentration identique des esters méthyliques de la biliverdine IX α et du pigment bleu des coquilles d'œufs d'Emeu sont superposables.

b) *Solution acide* : La solution chloroformique précédente, après addition de deux gouttes d'alcool méthylique chlorhydrique, vire au bleu-vert. Comme dans le cas de l'ester méthylique de la biliverdine, cette solution acide, ayant une absorption plus grande que la solution neutre, doit être diluée de moitié. Cette solution montre au spectrophotomètre un minimum d'absorption vers λ 495 m μ , et un maximum à λ 675 m μ (fig. 8). Là encore, les courbes d'absorption de l'ester méthylique de la biliverdine et du pigment des œufs d'Emeu, établies pour des concentrations identiques, sont superposables. Ne connaissant pas la concentration exacte de la solution acide, la courbe d'absorption est calculée en $\log. \epsilon$ (non moléculaire).

c) *Sel complexe de zinc* : Le virage au vert de la solution chloroformique neutre bleue, additionnée de quelques gouttes d'une solution alcoolique d'acétate de zinc à 1 %, est dû à la formation d'un sel complexe. La densité optique de cette solution croît régulièrement du violet au rouge, sans qu'il nous soit possible de déceler un maximum dans le visible à l'aide du spectrophotomètre. L'addition d'une solution alcoolique d'iode à 1 % provoque, outre le passage de la teinte verte au bleu, l'apparition d'une intense fluorescence rouge et d'un spectre d'absorption à deux bandes dont les maxima se situent respectivement à λ 640 m μ et λ 590 m μ (fig. 9). La courbe d'absorption est calculée en $\log. \epsilon$ (non moléculaire). Cette réaction caractéristique des biliverdines n'a pu être obtenue par D. DINELLI. Par contre, R. LEMBERG [71] situe les deux maxima du sel complexe de zinc de l'ester méthylique de l'oocyanine, après oxydation par l'ammoniaque et apparition de la fluorescence rouge, à λ 636 m μ et λ 685 m μ .

C. — CONCLUSION

Le pigment bleu des coquilles d'œufs d'Emeu, que nous avons obtenu cristallisé sous forme d'ester méthylique, est, dans toutes les propriétés étudiées (point de fusion, teneur en azote, solubilités, spectres d'absorption dans l'ultra-violet et le visible, comportement chromatographique), identique à l'ester méthylique de la biliverdine IX α . Ces résultats concordent avec ceux obtenus antérieurement par R. LEMBERG pour l'oocyanine des coquilles d'œufs de Mouettes [72], pigment que cet auteur a identifié avec la biliverdine.

Il ressort de ces recherches que la purification des pigments des coquilles des œufs d'Oiseaux est facilitée par la substitution de la méthode chromatographique aux procédés chimiques ordinaires. Sans cette méthode, il nous aurait été impossible de préparer un produit cristallisé en partant de trois coquilles.

En plus, du pigment bleu que nous venons d'étudier, l'analyse chromatographique montre l'existence d'un pigment jaune, se transformant par oxydation en biliverdine; ce pigment jaune est probablement de la bilirubine.

D. — PIGMENT BLEU DU SQUELETTE CALCAIRE
D'UN OCTOCORALLIAIRE : HELIOPORA CÆRULA PALL.

En raison de la couleur bleue de son squelette, *Heliopora cærulæ* a reçu le nom de corail bleu en opposition au corail rouge : *Corallium rubrum*. Bien que tous deux soient des Octocoralliaires, le premier appartient à la famille des Hélioporidés, alors que le second se classe parmi les Corallidés. Par son habitat et son aspect, *Heliopora* ressemble aux coraux (Hexacoralliaires) et se rencontre dans les récifs coralliens de Singapour au détroit de Torrès. De plus, son squelette calcaire forme une masse compacte se prolongeant en lobes ou en digitations aplaties ressemblant à des feuilles épaisses.

Le pigment du squelette calcaire d'*Heliopora cærulæ* a fait l'objet de quelques recherches anciennes qui n'ont apporté aucune conclusion précise sur sa nature chimique. Dès 1846, SILLIMAN [73] attribua une origine organique au pigment bleu d'*Heliopora*, puis H. N. MOSELEY [74], en 1875, après décalcification du polypier par l'acide chlorhydrique concentré, sépara une matière colorante partiellement soluble dans l'alcool en une liqueur bleu intense. G. C. BOURNE [75], en 1895, prépara d'une façon analogue un résidu pigmenté qui, après lavages à l'eau distillée, était insoluble dans l'alcool, mais soluble dans les liqueurs alcalines diluées. Ce pigment donnant avec l'acide nitrique concentré une solution violette virant au jaune, l'auteur conclut à sa parenté avec la murexide.

Enfin, LIVERSIDGE [76], en 1899, obtint un pigment brut dont il compara les propriétés avec celles de l'indigo vis-à-vis de solvants variés.

Ainsi, après avoir constaté l'insolubilité du pigment d'*Heliopora* dans les solvants organiques, ces divers auteurs n'apportèrent aucun éclaircissement sur sa nature chimique.

Récemment, G. RANSON et A. DURIVAUT [77], puis A. TIXIER-DURIVAUT [78], après avoir montré que les pigments d'*Alcyonium palmatum*, d'*Heliopora cærulea*, de *Corallium rubrum* et de *Tubipora musica* ne pouvaient être assimilés aux caroténoïdes,

émirent l'hypothèse d'une relation possible entre la pigmentation et la présence constante de fer dans les formations squelettiques de ces Alcyonaires. Enfin, nous avons exposé, en collaboration avec A. TIXIER-DURIVAUT [79] [80], dans une note préliminaire, le résultat de quelques-unes de nos premières conclusions.

L'échantillon que nous avons eu à notre disposition (1) formait une masse calcaire compacte, lobée dans sa portion supérieure, gris-bleu en surface, bleu intense en profondeur. Cette coloration bleue est unique chez les Octocoralliaires qui présentent en général des teintes jaune, orange, rouge ou violette. Pulvérisé, le polypier ne cède son pigment à aucun des produits suivants : alcools méthylique, éthylique et amylique, acétone, chloroforme, éther, sulfure de carbone, formol, acétate d'éthyle, benzine, éther de pétrole, pyridine et ammoniaque.

Par suite, le pigment bleu d'*Heliopora* ne pouvant être étudié sous sa forme originelle, il est nécessaire de détruire le substrat calcaire soit par l'acide chlorhydrique dilué, soit par l'alcool méthylique chlorhydrique. Dans le premier cas, après destruction du squelette calcaire par l'acide chlorhydrique, demeure un résidu pigmenté d'où la matière colorante peut être extraite par une solution légèrement alcaline. Bien que possédant les principales propriétés des bilirubinoïdes, le « pigment brut », précipité de cette solution alcaline par acidification, est insoluble dans les solvants organiques. Dans le second cas, l'alcool méthylique chlorhydrique dissout et estérifie le pigment, qui peut être extrait de la solution alcoolique acide par le chloroforme. Cet « ester méthylique » présente toutes les propriétés des esters méthyliques des pigments biliaries. Comme nous l'avons signalé antérieurement, les bilirubinoïdes et les porphyrines liés à des formations calcaires ne deviennent solubles dans le chloroforme qu'après traitement par l'alcool méthylique chlorhydrique.

I. — Etude du « pigment brut ».

A. — PRÉPARATION

1° DÉCALCIFICATION. — De menus fragments (100 gr.) du polypier, immergés dans de l'eau distillée, sont attaqués peu à peu par 600 cc. d'acide chlorhydrique dilué au 1/5 (1 volume d'acide chlorhydrique pur pour 4 volumes d'eau distillée), jusqu'à arrêt du dégagement de gaz carbonique. Le pigment floccule et se dépose en un précipité bleu-vert. Le liquide incolore surnageant, contenant des sels calcaires (chlorure et phosphate), ainsi que des traces de fer, est décanté et le résidu est centrifugé. Le culot bleu foncé ainsi obtenu est débarrassé de l'acide et des sels minéraux par plusieurs lavages à l'eau distillée. Lorsqu'après une dernière centrifugation, une très légère portion du pigment demeure en suspension, ces lavages sont arrêtés, car à ce moment les sels minéraux sont totalement éliminés; le liquide surnageant, faiblement coloré, est rejeté.

2° EXTRACTION. — Peu à peu, au cours des centrifugations successives, le pigment se rassemble à la partie supérieure du précipité et forme une couche superficielle bleu foncé. Ce précipité, remis en suspension dans l'eau distillée, est additionné de quelques

(1) Nous remercions M. RANSON, sous-directeur du Laboratoire de Malacologie, qui nous a très aimablement procuré cet échantillon.

gouttes d'une solution ammoniacale au 1/10 (1 volume d'ammoniaque pur pour 9 volumes d'eau distillée). Le pigment passe ainsi en totalité dans le liquide légèrement alcalin en donnant une solution bleu foncé. Un abondant résidu brun, insoluble, est séparé par centrifugation et la solution bleue est décantée.

3° PRÉCIPITATION. — Cette solution est additionnée goutte à goutte d'acide chlorhydrique au 1/10, jusqu'à virage du bleu au bleu-vert et précipitation du pigment. Ce précipité est recueilli par centrifugation, lavé plusieurs fois à l'eau distillée et desséché dans le vide en présence d'acide sulfurique.

100 gr. de polypier fournissent 0,04 gr. environ de « pigment brut ».

B. — PROPRIÉTÉS

NATURE CHIMIQUE DU PIGMENT. — La matière colorante ainsi obtenue brûle en ne laissant aucune trace de substances minérales. Sa teneur en azote, déterminée à l'aide de microdosages par la méthode de Kjeldhal, est de 8,5 %. Cette teneur élevée en azote, inférieure cependant à celle des matières protéiques, est comparable à celle des pigments biliaires.

ACTION DES SOLVANTS ORGANIQUES. — Le « pigment brut » sec est insoluble dans les solvants organiques : alcools méthylique, éthylique et amylique, éther, acétone, chloroforme, acétate d'éthyle, benzine, sulfure de carbone, éther de pétrole. Cependant, il est partiellement soluble dans l'alcool méthylique, l'alcool éthylique et l'acétone acidifiés par l'acide chlorhydrique.

ACTION DES BASES. — Le « pigment brut » est entièrement soluble dans les solutions alcalines, si diluées soient-elles. Ces solutions prennent des colorations différentes suivant les bases utilisées : en présence de pyridine ou d'ammoniaque étendue, elles sont d'un bleu pur ; avec la lessive de soude ou de potasse, bleues pour une faible basicité et vertes pour un pH plus élevé ; ces changements de teintes sont d'ailleurs réversibles.

Les solutions fortement basiques, abandonnées à l'air et à la lumière, deviennent jaunes par altération et ne reprennent plus leur teinte primitive après acidification. Le « pigment brut » se dissout également dans les solutions de bicarbonates et de carbonates alcalins, et donne des sels de calcium et de baryum insolubles. Ces solubilités d'une part, l'obtention facile d'un ester avec l'alcool méthylique chlorhydrique d'autre part, indiquent nettement la présence de fonctions acides dans le « pigment brut ». Ces fonctions acides ne deviennent libres qu'après décalcification du polypier par l'acide chlorhydrique, et le pigment originel, insoluble dans les alcalis, n'est vraisemblablement que le sel de calcium du « pigment brut ». Rappelons que les pigments biliaires, qui possèdent dans leur molécule deux fonctions acide propionique, ont des sels alcalins solubles, des sels alcalino-terreux insolubles et donnent des esters avec l'alcool méthylique chlorhydrique.

ACTION DES ACIDES. — Le « pigment brut » est insoluble dans les acides étendus ; soluble dans les acides concentrés, il donne avec les acides chlorhydrique et sulfurique une liqueur verte, et une solution bleu foncé avec les acides formique et acétique.

L'insolubilité du « pigment brut » dans les solvants organiques pouvant être due à une liaison protéique, nous avons essayé d'hydrolyser ce pigment en employant la tech-

nique préconisée par R. LEMBERG [81] pour les chromoprotéides des Algues. Le pigment, dissous dans l'acide chlorhydrique concentré, est chauffé à 80° au bain-marie pendant une heure en atmosphère d'azote; cependant, comme LEMBERG [82] pour le pigment d'*Haliotis californiensis*, nous n'avons obtenu, après dilution, aucun produit soluble dans l'alcool amylique, le chloroforme ou l'acétate d'éthyle. Ainsi, l'insolubilité du « pigment brut » dans les solvants organiques ne semble pas due à une liaison protéique.

RÉACTION DE GMELIN. — En solution alcoolique acide, le « pigment brut » bleu-vert donne avec l'acide nitrique nitreux les teintes bleue, bleu-violet, violette, rouge, orange et jaune. La succession de ces phases colorées dans l'ordre précédent constitue la réaction de Gmelin, caractéristique des pigments biliaires. La biliverdine donne les mêmes phases colorées.

ETUDE SPECTRALE. — L'examen spectroscopique de la solution ammoniacale bleue décèle, dans l'orange et le jaune, une bande d'absorption comprise entre λ 608 m μ et λ 570 m μ (axe : λ 589 m μ). En outre, la région rouge du spectre est obscurcie jusqu'à λ 650 m μ , l'indigo et le violet à partir de λ 445 m μ . Les solutions de biliverdine légèrement oxydées présentent, en plus de l'assombrissement du rouge, cette bande d'absorption d'axe : λ 589 m μ .

La solution alcoolique acide montre, sous une faible épaisseur, une bande d'absorption comprise entre λ 692 m μ et λ 670 m μ (axe : λ 681 m μ), spectre comparable à celui de la biliverdine en milieu acide.

SEL COMPLEXE DE ZINC. — En solution ammoniacale, le « pigment brut » donne avec l'acétate de zinc une solution verte n'offrant pas de fluorescence rouge nette, mais présentant, pour une concentration suffisante, le spectre caractéristique du sel complexe de zinc de la biliverdine oxydée. L'extrême rouge est absorbé jusqu'à λ 670 m μ environ,

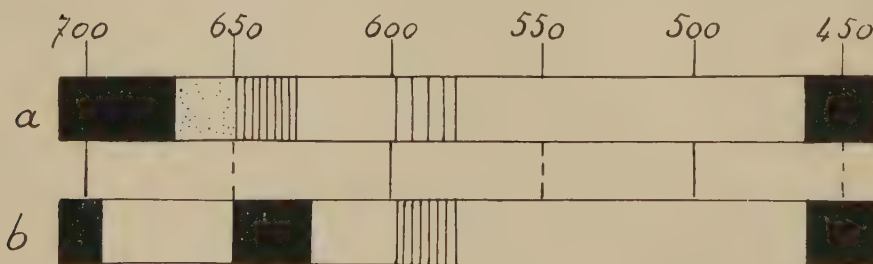


FIG. 12. — Spectres du sel complexe de zinc d'*Heliopora* :
a : avant addition d'iode; b : après addition d'iode.

puis vient une zone ombrée suivie d'une bande sombre comprise entre λ 648 m μ et λ 626 m μ (axe : λ 637 m μ). Nous percevons en outre une seconde bande plus floue de λ 599 m μ à λ 579 m μ (axe : λ 589 m μ), et l'assombrissement de l'indigo et du violet (fig. 12, a).

Une solution du sel complexe de zinc de la biliverdine pure ne présente que l'absorption dans l'extrême rouge.

Après addition de quelques gouttes d'une solution alcoolique d'iode à 1 %, apparaît peu à peu une fluorescence rouge intense. A l'examen spectroscopique, alors que les deux bandes d'absorption précédentes sont renforcées, l'absorption dans l'extrême rouge a disparu (fig. 12, b).

Dans les mêmes conditions, la biliverdine donne un sel de zinc présentant une intense fluorescence rouge et un spectre à deux bandes d'absorption, comparables par leur position à celles observées avec le sel de zinc du « pigment brut ».

ACTION DE L'ALCOOL MÉTHYLIQUE CHLORHYDRIQUE. — Comme nous l'avons signalé précédemment, les pigments biliaires liés à des formations calcaires ne deviennent solubles dans les solvants organiques qu'après traitement par l'alcool méthylique chlorhydrique qui les dissout et les estérifie. Il en est de même pour le « pigment brut » d'*Heliopora* qui, après dissolution dans l'alcool méthylique chlorhydrique et estérification, peut ensuite être extrait par le chloroforme et l'acétate d'éthyle. Le produit ainsi obtenu présente les caractères et les solubilités des esters méthyliques des pigments biliaires. Les fonctions acides étant estérifiées, le pigment ne peut être enlevé de sa solution chloroformique par les solutions alcalines. L'insolubilité du « pigment brut » dans les solvants organiques ne semble pas due à une liaison protéique; la teneur en azote et le fait que nous n'avons pu obtenir par hydrolyse un produit soluble dans le chloroforme vont à l'encontre d'une telle hypothèse. La préparation et les propriétés de l'ester méthylique du pigment d'*Heliopora* seront étudiées ultérieurement.

PRODUITS D'OXYDATION ET DE RÉDUCTION. — Les produits d'oxydation et de réduction du « pigment brut » sont moins faciles à obtenir et à observer que ceux de l'ester méthylique; aussi les étudierons-nous en détail à propos de ce dernier.

Signalons cependant que la phase jaune, terme ultime de l'oxydation du « pigment brut » par l'acide nitrique nitreux, rappelle la cholétéline par son spectre à une seule bande d'absorption d'axe : λ 490 m μ , et par la fluorescence verte intense de son sel de zinc.

C. — CONCLUSION

Le « pigment brut » d'*Heliopora*, de nature organique, présente les principales propriétés des pigments biliaires, mais se montre insoluble dans les solvants des bilirubinoïdes. Il s'apparente étroitement aux pigments biliaires liés à des formations calcaires telles que la biliverdine des œufs de Mouettes et d'Emeus. Cependant, traité par l'alcool méthylique chlorhydrique, il donne un ester méthylique soluble dans le chloroforme.

II. — Etude de l'ester méthylique.

A. — PRÉPARATION

L'ester méthylique du pigment bleu d'*Heliopora* peut s'obtenir en traitant par l'alcool méthylique chlorhydrique soit le polypier lui-même, soit le « pigment brut ».

A) A PARTIR DU POLYPIER. — 1° *Décalcification et estérification* : Le squelette calcaire finement pulvérisé (100 gr.) est peu à peu attaqué par de l'alcool méthylique chlorhydrique renfermant 14 gr. de gaz chlorhydrique pour 100 cc. d'alcool. Au fur et à mesure de la destruction du substrat calcaire, le pigment se dissout et s'estérifie; la solution étant saturée de gaz carbonique, le pigment est ainsi soustrait à l'action de

l'oxygène de l'air et son altération est évitée. Après arrêt du dégagement de gaz carbonique, la solution alcoolique acide, bleu-vert, est abandonnée quelques heures à l'obscurité, afin de permettre l'estérification de la totalité du pigment.

2° *Extraction* : 500 cc. de la solution alcoolique sont ensuite additionnés de 200 cc. de chloroforme, puis d'eau distillée jusqu'à séparation de la couche chloroformique. Cette couche chloroformique contenant le pigment est soutirée, puis lavée plusieurs fois avec 50 cc. d'eau distillée pour éliminer l'acide et les sels minéraux. Après deux lavages avec 50 cc. d'une solution de soude normale, la teinte de la solution chloroformique vire au bleu indigo. De nouveau lavée à l'eau distillée, la solution chloroformique est finalement filtrée sur un filtre sec et déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre.

B) À PARTIR DU « PIGMENT BRUT ». — *Estérification et extraction* : La solution partielle du « pigment brut », dans 100 cc. d'alcool méthylique chlorhydrique renfermant 7 gr. de gaz chlorhydrique pour 100 cc. d'alcool, est abandonnée douze heures en atmosphère d'azote à l'obscurité. Puis la solution alcoolique bleue, débarrassée du pigment insoluble par centrifugation, est additionnée de 100 cc. de chloroforme et d'eau distillée. La solution chloroformique de l'ester méthylique est ensuite traitée selon la technique précédente.

B. — PURIFICATION

Après filtration, la solution chloroformique est concentrée dans le vide à 10 cc. environ, puis additionnée de 4 volumes d'éther anhydre. Le pigment floccule en un fin précipité bleu amorphe qui est recueilli par centrifugation, puis desséché dans le vide.

A partir de 100 gr. de polypier, nous avons ainsi obtenu 9 mgr. d'ester méthylique.

Des essais de purification par chromatographie sur alumine ne nous ont donné aucun résultat satisfaisant.

C. — PROPRIÉTÉS

SOLUBILITÉS ET PROPRIÉTÉS DES SOLUTIONS. — L'ester méthylique, ainsi obtenu, se présente sous forme d'une poudre bleu foncé presque noir, très soluble dans le chloroforme et l'acétate d'éthyle, moins soluble dans les alcools méthylique et éthylique, très peu soluble dans l'éther, insoluble enfin dans le sulfure de carbone, la benzine et l'éther de pétrole. Ces solubilités sont identiques à celles que nous avons observées pour l'ester méthylique de la biliverdine. Les esters méthyliques de la biliverdine et du pigment d'*Heliopora* sont précipités l'un et l'autre de leur solution chloroformique par addition de 3 volumes d'éther. Ces pigments sont également extraits de leur solution étherée par de l'acide chlorhydrique N/10.

Les solutions du pigment d'*Heliopora* sont très sensibles à l'action de la lumière, surtout à celle de l'oxygène de l'air; abandonnées à ces influences, elles s'altèrent progressivement en devenant violettes. Cette sensibilité, commune à tous les bilirubinoïdes, est d'autant plus grande que le pigment est plus pur. C'est ainsi que le « pigment total » ou originel est très résistant aux agents atmosphériques et pratiquement inaltérable, alors que le « pigment brut », déjà sensible à l'oxydation, change rapidement de teinte lorsque le pH est acide ou alcalin; l'ester méthylique, enfin, ne peut se conserver qu'en atmosphère d'azote et à l'obscurité.

De même que la plupart des bilirubinoïdes, le pigment d'*Heliopora* se comporte comme un indicateur coloré et ses solutions changent de teinte suivant le pH du milieu. Nous avons déjà signalé que la solution faiblement alcaline bleue du « pigment brut » devient verte pour un pH plus élevé; de même, bleu en milieu acide organique, le « pigment brut » est vert dans les acides minéraux concentrés. La solution chloroformique de l'ester méthylique bleu-vert en milieu acide est bleu indigo en milieu neutre ou alcalin. L'ester méthylique de la biliverdine présente un virage analogue; bleu-vert en solution acide, il devient bleu en milieu neutre ou alcalin. La teinte de la solution acide est due à la formation d'un chlorhydrate que de simples lavages à l'eau distillée peuvent dissocier. Les solutions chloroformiques acide ou neutre des esters méthyliques d'*Heliopora* et de la biliverdine ont cependant des colorations un peu différentes, celles de la biliverdine étant plus vertes. Enfin, agitées avec les acides chlorhydrique ou sulfurique concentrés, les solutions chloroformiques de ces deux pigments prennent une coloration verte.

RÉACTION DE GMELIN. — La solution chloroformique de l'ester méthylique d'*Heliopora* traitée par l'acide nitrique nitreux donne les diverses phases bleue, violette, rouge, orange et jaune de la réaction de Gmelin; la même succession de teintes s'observe avec la biliverdine.

ANALYSE SPECTRALE. — L'examen de la solution chloroformique neutre bleu indigo permet de déceler deux bandes d'absorption situées : l'une, dans le rouge, entre λ 684 m μ et λ 636 m μ (axe : λ 660 m μ) ; l'autre, peu nette, dans le jaune, entre λ 600 m μ et λ 566 m μ

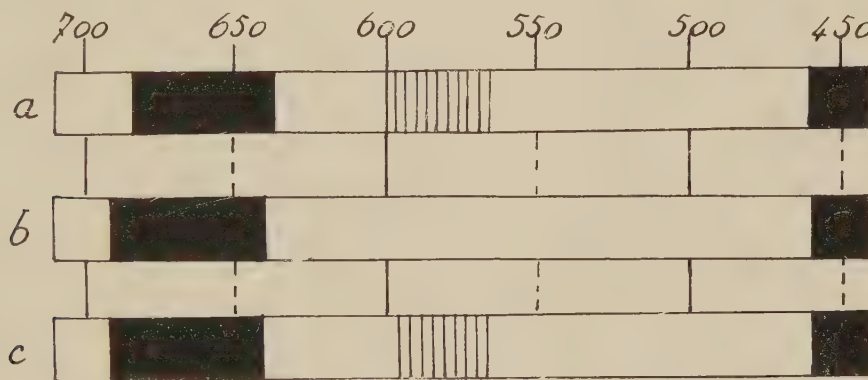


FIG. 13. — Spectres de la solution neutre de l'ester méthylique :
a : d'*Heliopora*; b : de la biliverdine pure; c : de la biliverdine oxydée.

(axe : λ 583 m μ) (fig. 13, a). En outre, l'indigo et le violet sont absorbés à partir de λ 460 m μ . Les solutions chloroformiques des esters méthyliques de la biliverdine et du pigment des coquilles d'œufs d'Emeu présentent dans le rouge une bande d'absorption analogue d'axe λ 665 m μ (fig. 13, b). De plus, la bande d'axe λ 583 m μ s'observe avec des solutions légèrement oxydées de ces pigments (fig. 13, c); l'apparition de cette bande est due à la formation de bilipurpurines, pigments qui constituent la phase violette de la réaction de Gmelin.

La solution chloroformique acide bleue, examinée sous une faible épaisseur, présente dans le rouge une bande d'absorption comprise entre λ 680 m μ et λ 660 m μ (axe : λ 670 m μ);

l'indigo et le violet sont obscurcis à partir de λ 440 $m\mu$ environ. Ce spectre est analogue à ceux des solutions chloroformiques acides des esters méthyliques de la biliverdine IX α et du pigment des coquilles d'œufs d'Emeu, ces deux bilirubinoïdes ayant une bande d'absorption comprise entre λ 686 $m\mu$ et λ 664 $m\mu$ (axe : λ 675 $m\mu$).

SELS COMPLEXES DE ZINC. — L'addition d'une liqueur alcoolique d'acétate de zinc à la solution chloroformique bleue de l'ester méthylique de la biliverdine provoque la formation d'un complexe vert. La solution verte ainsi obtenue ne présente pas de spectre caractéristique, mais seulement une forte absorption dans le rouge (fig. 14, *b*). Cependant, oxydée par l'iode, cette solution devient rapidement bleue et présente alors une intense fluorescence rouge et un spectre à deux bandes d'absorption (fig. 14, *d*). Cette réaction, caractéristique des pigments biliaires du groupe de la biliverdine, est due à la formation de bilipurpurines dont les sels complexes de zinc bleus offrent une intense fluorescence

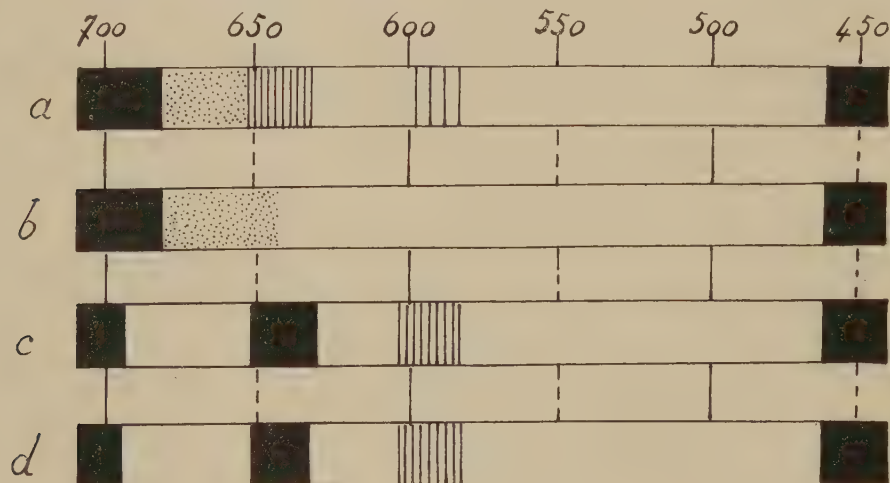


FIG. 14. — Spectres des sels complexes de zinc des esters méthyliques :
a : d'*Heliopora* ; *b* : de la biliverdine ; *c* : d'*Heliopora* après addition d'iode ;
d : de la biliverdine après addition d'iode.

rouge et un spectre à deux bandes d'absorption. Or, la teinte de la solution chloroformique de l'ester méthylique d'*Heliopora*, après addition de quelques gouttes d'une liqueur alcoolique d'acétate de zinc à 1 %, passe du bleu au vert. Cette solution verte présente le spectre d'absorption du sel complexe de zinc de la biliverdine légèrement oxydée. En effet, outre la forte absorption de la région rouge du spectre, elle montre les deux bandes des sels de zinc des bilipurpurines : la première entre λ 654 $m\mu$ et λ 630 $m\mu$ (axe : λ 642 $m\mu$) ; la seconde, floue, entre λ 604 $m\mu$ et λ 582 $m\mu$ (axe : λ 593 $m\mu$) ; elle possède, en outre, une légère fluorescence rouge. Enfin, l'indigo et le violet sont obscurcis à partir de λ 460 $m\mu$ (fig. 14, *a*).

L'oxydation ménagée du pigment en solution chloroformique à l'aide de bioxyde de plomb aqueux provoque le renforcement graduel des deux bandes d'absorption du sel complexe, l'augmentation de la fluorescence et la diminution de l'assombrissement du rouge. Ces observations montrent que les deux bandes d'absorption du sel complexe et la légère fluorescence rouge ne sont pas dues au pigment lui-même, mais à la présence de produits supérieurs d'oxydation, tandis que l'absorption de l'extrême rouge lui est propre.

Par addition d'une goutte d'une solution alcoolique d'iode à 1 %, la liqueur du sel complexe devient rapidement bleue et offre alors une intense fluorescence rouge. Les deux bandes d'absorption sont renforcées alors que le rouge est transmis intégralement (fig. 14, c) :

$$\begin{aligned} \text{I} &: \lambda 654 \text{ m}\mu - \lambda 630 \text{ m}\mu \text{ (axe : } \lambda 642 \text{ m}\mu\text{).} \\ \text{II} &: \lambda 604 \text{ m}\mu - \lambda 582 \text{ m}\mu \text{ (axe : } \lambda 593 \text{ m}\mu\text{).} \end{aligned}$$

L'intensité de l'absorption de la bande I est plus grande que celle de la bande II ($I > II$).

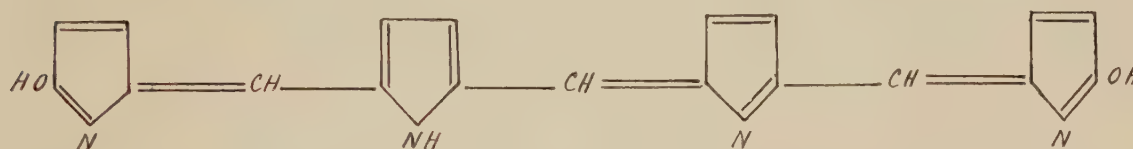
En outre, nous avons constaté dans quelques cas un déplacement des bandes d'absorption vers les courtes longueurs d'ondes :

$$\begin{aligned} \text{I} &: \lambda 648 \text{ m}\mu - \lambda 626 \text{ m}\mu \text{ (axe : } \lambda 637 \text{ m}\mu\text{).} \\ \text{II} &: \lambda 596 \text{ m}\mu - \lambda 576 \text{ m}\mu \text{ (axe : } \lambda 586 \text{ m}\mu\text{).} \\ I &> II. \end{aligned}$$

Les spectres des sels complexes de zinc de la biliverdine et du pigment des coquilles d'œufs d'Emeu, après oxydation par l'iode, sont identiques (fig. 14, d) :

$$\begin{aligned} \text{I} &: \lambda 652 \text{ m}\mu - \lambda 632 \text{ m}\mu \text{ (axe : } \lambda 642 \text{ m}\mu\text{).} \\ \text{II} &: \lambda 604 \text{ m}\mu - \lambda 582 \text{ m}\mu \text{ (axe : } \lambda 593 \text{ m}\mu\text{).} \\ I &> II. \end{aligned}$$

Par contre, le sel complexe de zinc de la glaucobiline, après oxydation par l'iode, possède deux bandes d'absorption dont les positions sont déplacées vers les courtes longueurs d'ondes : l'axe de la bande principale se situant à $\lambda 627 \text{ m}\mu$. Tous les bilirubinoïdes ayant, comme la biliverdine et la glaucobiline, une constitution fondamentale



bili-triène donnent la réaction précédente (formule) ; ceux qui contiennent dans leur molécule deux groupes vinyle (biliverdine, ptérobiline) ont leur bande principale à $\lambda 642 \text{ m}\mu$; par contre, ceux qui possèdent deux radicaux éthyle (glaucobiline) ont leur bande principale à $\lambda 627 \text{ m}\mu$.

De plus, après addition d'iode, les bandes d'absorption des bilirubinoïdes du premier groupe se déplacent vers les courtes longueurs d'ondes, alors que celles des pigments du second groupe restent inchangées. Cette constatation, due à E. GRAMS [83], permet ainsi de mettre facilement en évidence la présence de fonctions vinyle dans ce groupe de bilirubinoïdes appartenant à la phase bleu-vert de la réaction de Gmelin.

Signalons enfin qu'après oxydation en milieu ammoniacal, le sel complexe de zinc de l'ester méthylique de l'oocyanine devient fluorescent et présente une bande d'absorption foncée à $\lambda 636 \text{ m}\mu$, et une bande plus faible à $\lambda 585 \text{ m}\mu$ [84] :

Esters méthyliques	<i>Helioport</i>	Biliverdine	Glaucobiline
Solution neutre.....	bleu indigo.	bleue.	bleue.
Sel de zinc	vert.	vert.	vert.
Sel de zinc + I.....	bleu.	bleu.	bleu.
» (fluorescence).....	rouge.	rouge.	rouge.
» (spectre).....	I : $\lambda 642 \text{ m}\mu$.	I : $\lambda 642 \text{ m}\mu$.	I : $\lambda 627 \text{ m}\mu$.

SEL COMPLEXE DE CUIVRE. — Ce sel s'obtient en agitant une solution chloroformique de l'ester méthylique avec une solution aqueuse diluée d'acétate de cuivre. La solution chloroformique vert jaune est ensuite lavée et déshydratée. L'examen spectroscopique décèle deux bandes d'absorption : l'une dans le rouge; la seconde, floue, dans l'orange et le jaune :

$$\begin{aligned} \text{I} : \lambda 662 \text{ m}\mu - \lambda 640 \text{ m}\mu (\text{axe} : \lambda 651 \text{ m}\mu). \\ \text{II} : \lambda 612 \text{ m}\mu - \lambda 582 \text{ m}\mu (\text{axe} : \lambda 597 \text{ m}\mu). \\ \text{I} > \text{II}. \end{aligned}$$

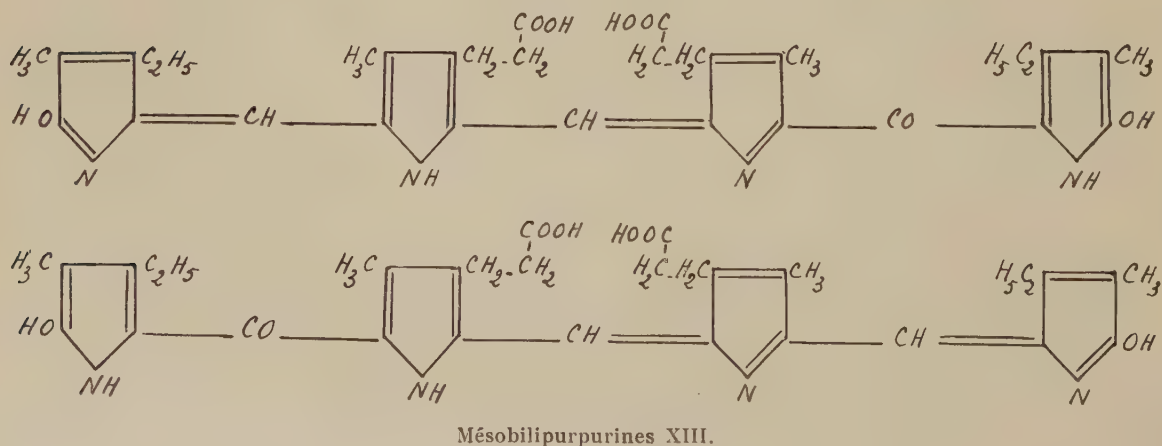
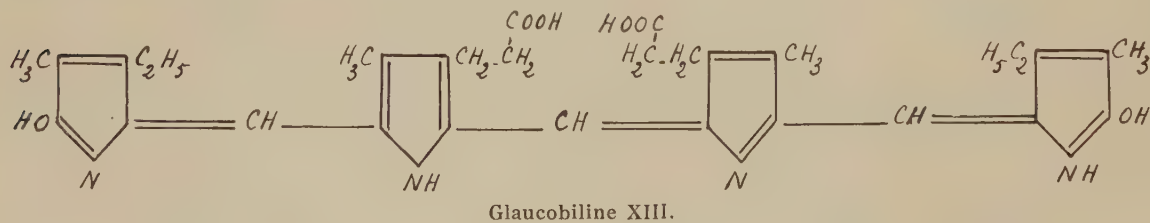
Ces deux bandes sont déplacées vers le rouge par rapport à celles du sel complexe de zinc. En outre, l'extrême rouge est absorbé jusqu'à $\lambda 695 \text{ m}\mu$, et le violet à partir de $\lambda 450 \text{ m}\mu$ environ.

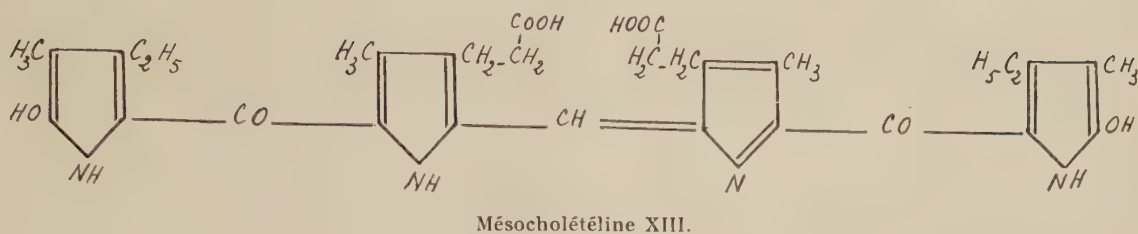
OXYDATION. — Les produits d'oxydation de l'ester méthylique de la biliverdine présentant des réactions et des spectres d'absorption caractéristiques, nous les avons comparés à ceux de l'ester méthylique du pigment d'*Helioportia*.

Ces dernières années, H. FISCHER et son école d'une part, W. SIEDEL d'autre part, ont élucidé le mécanisme de la réaction de Gmelin et isolé les pigments constitutifs des diverses phases colorées.

Rappelons tout d'abord que la mésobilirubine possède deux groupes éthyle en remplacement des radicaux vinyle de la bilirubine; ces deux pigments correspondent à la phase initiale jaune de la réaction de Gmelin.

La bilirubine par oxydation et selon un processus de déshydrogénation conduit à la biliverdine, tandis que la mésobilirubine donne la glaucobiline. Les bilirubinoïdes appartenant à cette phase sont verts, bleu-vert ou bleus, et donnent des sels de zinc verts non fluorescents, sans spectre caractéristique.





W. SIEDEL [85] [86] isole deux pigments isomères succédant à la glaucobiline : les mésobilipurpurines, correspondant à la phase violette de la réaction de Gmelin. Ces bilirubinoïdes ont des sels complexes de zinc bleus dont l'intense fluorescence rouge et les spectres à deux bandes d'absorption sont très caractéristiques. Or, le sel zincique complexe vert d'*Heliopora* oxydé par l'iode devient rapidement bleu et présente alors une intense fluorescence rouge et deux bandes d'absorption. Décomposé par un acide minéral, ce sel complexe donne la phase violette de la réaction de Gmelin; la fluorescence disparaît et la solution obtenue montre deux bandes très nettes d'égale intensité, reliées par une partie ombrée (fig. 15, a) :

I : λ 621 m μ — λ 598 m μ (axe : λ 609,5 m μ).
 II : λ 582 m μ — λ 550 m μ (axe : λ 566 m μ).
 I = II.

Les sels complexes bleus fluorescents de l'ester méthylique de la biliverdine et du pigment des coquilles d'œufs d'Emeu, après décomposition par un acide minéral, donnent des solutions violettes dont les spectres (fig. 15, b, c), identiques au précédent, sont pour le premier :

I : λ 620 m μ — λ 598 m μ (axe : λ 609 m μ).
 II : λ 577 m μ — λ 558 m μ (axe : λ 567,5 m μ).

et, pour le second :

I : λ 619 m μ — λ 594 m μ (axe : λ 606,5 m μ).
 II : λ 581 m μ — λ 551 m μ (axe : λ 566 m μ).

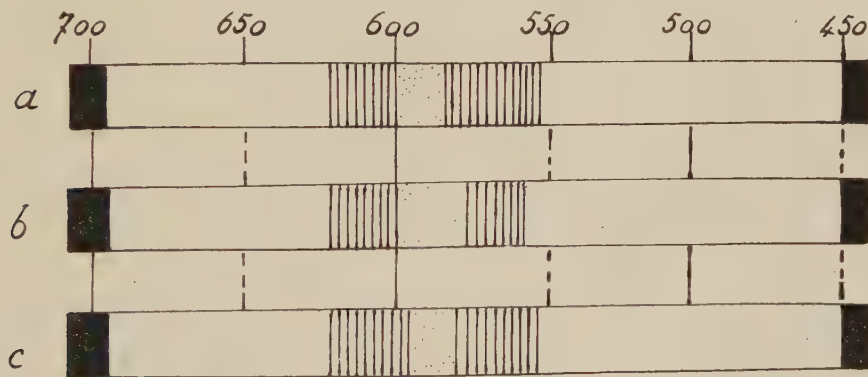


Fig. 15. — Spectres des solutions violettes des esters méthyliques :
 a : d'*Heliopora*; b : de la biliverdine IX a; c : de la biliverdine des coquilles d'œufs d'Emeu.

Ces bandes d'absorption dites, jusqu'à ces dernières années, bandes de la bilicyanine, sont en réalité dues à la superposition des spectres des bilipurpurines, pigments non encore isolés.

Nous obtenons un produit identique en oxydant l'ester méthylique du pigment d'*Heliopora* en solution chloroformique par l'acide nitrique nitreux jusqu'à la phase violette. L'oxydation est arrêtée à ce stade par agitation de la solution chloroformique avec la soude normale. Cette solution, qui devient rouge, est déshydratée après lavages à l'aide de sulfate de sodium desséché. L'addition d'acétate de zinc fait virer au bleu la solution neutre rouge et provoque l'apparition d'une intense fluorescence rouge. Les bandes d'absorption de cette liqueur ont des positions semblables à celles du sel complexe vert d'*Heliopora* oxydé par l'iode :

$$\begin{aligned} \text{I} &: \lambda \text{ 652 m}\mu - \lambda \text{ 632 m}\mu \text{ (axe : } \lambda \text{ 642 m}\mu\text{).} \\ \text{II} &: \lambda \text{ 604 m}\mu - \lambda \text{ 582 m}\mu \text{ (axe : } \lambda \text{ 593 m}\mu\text{).} \end{aligned}$$

Phases de r. Gmelin	Pigments	Sels de zinc	Fluorescence	Spectre
Bleu-vert	Biliverdine. Glaucobiline.	vert.	0	0
Violette.....	Bilipurpurines. Mésobilipurpurines.	bleu.	rouge.	2 bandes.
Jaune.....	Cholétéline. Mésocholétéline.	rose.	verte.	1 bande.

Poussant plus loin l'oxydation de la mésobilirubine, W. SIEDEL obtint la mésocholétéline correspondant à la phase jaune orange terminale de la réaction de Gmelin, et donnant un sel de zinc rose dont l'intense fluorescence verte et le spectre d'absorption rappellent l'urobiline.

Le produit d'oxydation jaune de l'ester méthylique de la biliverdine en solution chloroformique (cholétéline), non encore obtenu cristallisé, possède des réactions identiques.

En poursuivant l'oxydation de l'ester du pigment d'*Heliopora* en solution chloroformique par l'acide nitrique nitreux, nous obtenons la phase jaune ultime de la réaction de Gmelin. Cette solution chloroformique jaune orange présente un spectre d'absorption à une seule bande dont la position est identique à celle de la bande de la cholétéline :

$$\lambda \text{ 510 m}\mu \dots \lambda \text{ 502 m}\mu - \lambda \text{ 482 m}\mu \text{ (axe : } \lambda \text{ 492 m}\mu\text{).}$$

Après addition d'acétate de zinc, la solution chloroformique devient rose et présente une fluorescence verte et un spectre comparable à celui du sel complexe de la cholétéline :

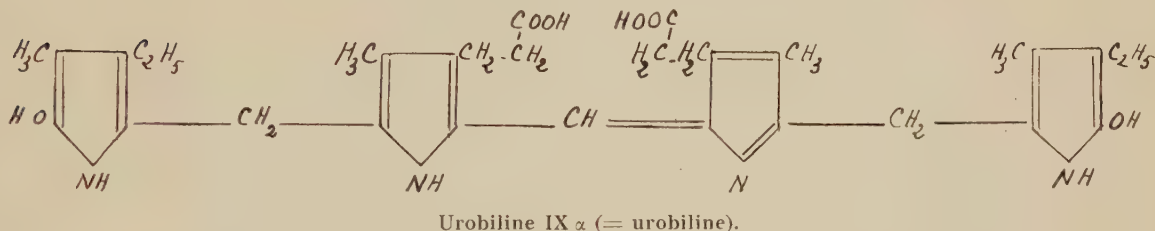
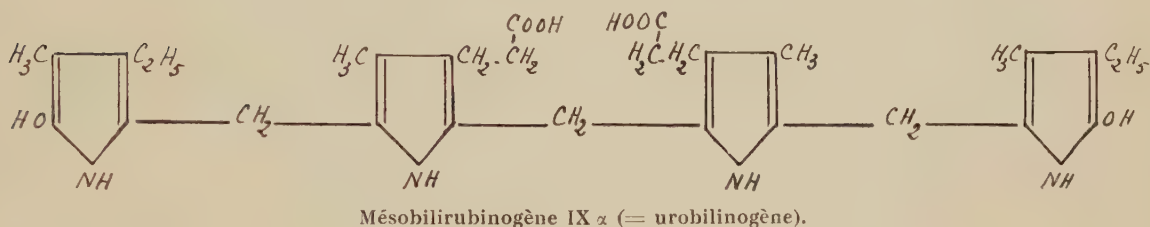
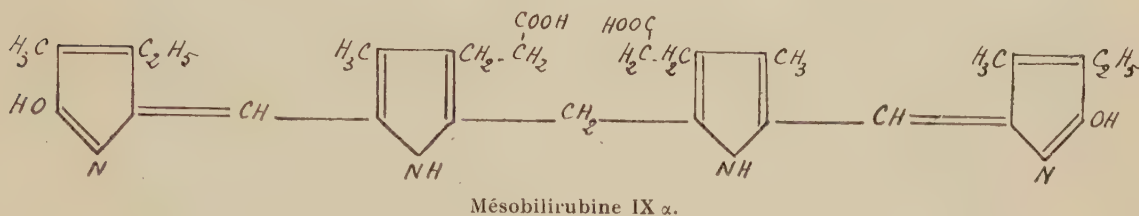
$$\lambda \text{ 521 m}\mu - \lambda \text{ 499 m}\mu \text{ (axe : } \lambda \text{ 510 m}\mu\text{).}$$

RÉDUCTION. — La bilirubine traitée par l'amalgame de sodium est réduite en mésobilirubine, puis en mésobilirubinogène. Cette dernière substance est incolore et donne avec la paradiméthylaminobenzaldéhyde un produit de condensation rouge. En outre, oxydée par l'iode, elle donne l'urobiline dont le sel de zinc possède une fluorescence verte.

La réduction de l'ester méthylique du pigment d'*Heliopora* conduit à des produits similaires. Agitée pendant plusieurs heures avec l'amalgame de sodium, la solution alcoolique de l'ester devient verte, puis jaune, donnant ainsi la phase colorée initiale de la réaction de Gmelin correspondant à la bilirubine et à la mésobilirubine.

La solution devenue finalement incolore est, après filtration, additionnée de chloroforme et d'eau. La couche chloroformique soutirée, lavée et déshydratée, est séparée en deux fractions. La première, après addition d'acétate de zinc et d'iode, prend une teinte rose et présente une intense fluorescence verte et un spectre superposable à celui du sel complexe de l'urobiline :

520 m μ — 498 m μ (axe : 509 m μ).



Après décomposition de ce sel par acidification, la fluorescence disparaît, la teinte devient jaune doré et le spectre présente la bande de l'urobiline à la limite du vert et du bleu :

λ 496 m μ — λ 484 m μ (axe : λ 490 m μ).

Après évaporation de la seconde fraction, le pigment incolore repris par l'alcool et additionné de paradiméthylaminobenzaldéhyde dissous dans l'acide chlorhydrique, donne une coloration rouge intense et offre deux bandes d'absorption :

I : λ 563 m μ — λ 549 m μ (axe : λ 556 m μ).
 II : λ 500 m μ — λ 482 m μ (axe : λ 491 m μ).

Ces deux bandes sont comparables à celles que présente le produit de condensation du mésobilirubinogène avec la paradiméthylaminobenzaldéhyde.

COMPARAISON AVEC LA PHYCOCYANOBILINE ET LA MÉSOBILIVIOLINE. — Bien que se rapprochant de la phycocyanobiline par ses solubilités et par la couleur bleue de ses solutions acides, le pigment d'*Heliopora* s'en distingue nettement par la plupart de ses autres propriétés. En particulier, le sel complexe de zinc bleu-vert de la phycocyanobi-

line possède une intense fluorescence rouge, alors que le sel complexe du pigment d'*Heliopora* ne présente une telle fluorescence qu'après addition d'iode. De plus, les spectres des sels complexes de zinc de ces deux pigments diffèrent nettement par les positions de leurs bandes d'absorption dont les axes se situent :

pour la phycocyanobiline.....	à I : λ 632 m μ et II : λ 585 m μ .
pour le pigment d' <i>Heliopora</i>	à I : λ 642 m μ et II : λ 593 m μ .

Des différences analogues existent entre le pigment d'*Heliopora* et la mésobilivoline.

ORIGINE DU PIGMENT. — La présence d'un bilirubinoïde comme matière colorante du squelette calcaire d'*Heliopora cærulea* est extrêmement curieuse, d'autant plus que ce Coelentéré des mers chaudes est seul parmi les Octocoralliaires à posséder une pigmentation bleue. La biologie de cet animal étant très mal connue, nous ne pouvons émettre que de vagues hypothèses sur l'origine du pigment bleu du squelette calcaire. En premier lieu, nous pouvons supposer que les polypes se nourrissent d'Algues microscopiques dont les chromoprotéïdes seraient à l'origine du pigment. Ce dernier, excrété en quelque sorte par l'animal, se fixerait sur le squelette calcaire. En second lieu, nous pouvons penser que ce bilirubinoïde prend naissance aux dépens de pigments respiratoires intracellulaires pendant la formation du squelette calcaire. Cette dernière hypothèse, analogue à celle émise par CH. DHÉRE [87] sur l'origine des pigments biliaires des coquilles de Mollusques, nous semble la plus vraisemblable.

D. — CONCLUSION

En traitant le squelette calcaire d'*Heliopora cærulea* par l'alcool méthylique chlorhydrique, nous en avons extrait le pigment bleu sous forme d'ester méthylique. Ainsi obtenu, le pigment d'*Heliopora* présente les solubilités et les réactions des pigments biliaires. De même que les bilirubinoïdes possédant une constitution fondamentale bilistriène, il donne, avec l'acétate de zinc et l'iode, un sel complexe bleu possédant une fluorescence rouge et un spectre à deux bandes d'absorption dont les positions sont identiques à celles des sels complexes de la biliverdine et de la ptérobiline. En outre, les produits d'oxydation de l'ester méthylique du pigment d'*Heliopora* sont comparables par leurs propriétés à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec l'ester méthylique de la biliverdine (bilipurpurines, cholétéline). De même les produits de réduction présentent les réactions du mésobilirubinogène et de l'urobiline.

Nous n'avons pu cependant isoler le pigment d'*Heliopora* à l'état cristallisé, des essais de purification par chromatographie sur alumine ne nous ayant donné aucun résultat satisfaisant. Ainsi, bien que présentant de grandes analogies avec l'ester méthylique de la biliverdine, le pigment d'*Heliopora* diffère de ce bilirubinoïde par son comportement chromatographique. Il se distingue également de l'ester méthylique de la ptérobiline : en effet, ce dernier pigment ne peut être extrait de sa solution étherée que par l'acide chlorhydrique normal, alors que la matière colorante d'*Heliopora*, de même que l'ester méthylique de la biliverdine, sont enlevés à ce solvant par l'acide chlorhydrique décimal.

Ainsi, le pigment bleu d'*Heliopora* ne pouvant être assimilé à aucun autre bilirubinoïde actuellement connu, nous proposons de lui donner le nom d'*hélioporobiline*, afin de rappeler sa parenté avec les pigments biliaires.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Au cours de ce travail, nous avons entrepris l'étude de quelques pigments tétrapyrroliques liés à des formations calcaires (coquilles de Mollusques, coquilles d'œufs d'Oiseaux, squelette calcaire d'un Octocoralliaire).

Dans la première partie, nous avons exposé les résultats de nos recherches sur les porphyrines des coquilles de Mollusques Bivalves de la famille des Ptéridés (*Pteria macroptera*, *P. margaritifera*), et de Mollusques Gastéropodes de la famille des Trochidés (*Clanculus pharaonis*, *Trochus virgatus* et *T. maculatus*). La porphyrine des coquilles de *Pteria* (*Avicula*) *macroptera* a été séparée des autres matières colorantes qui l'accompagnaient par chromatographie sur alumine, et cristallisée sous forme d'ester méthylique. Par son point de fusion (295°) et par celui de son sel complexe de cuivre (345° - 347°), par sa teneur en azote, par ses solubilités, ainsi que par ses spectres d'absorption dans l'ultra-violet et le visible, ce pigment s'apparente à l'uroporphyrine I. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par H. FISCHER, qui a identifié les porphyrines des coquilles de *Pteria radiata* et *P. vulgaris* avec l'uroporphyrine I. Au cours de la chromatographie, nous n'avons pas décelé la présence d'uroporphyrine III qui accompagne généralement l'uroporphyrine I dans les cas de porphyries. L'emploi de l'analyse chromatographique nous a également permis de signaler l'existence à l'état de traces d'une uroporphyrine dans les coquilles de *Pteria margaritifera*.

Nous avons aussi obtenu à l'état cristallisé la porphyrine des coquilles de *Clanculus pharaonis*, et montré la présence d'une porphyrine dans les coquilles de *Trochus virgatus* et *T. maculatus*. Ces diverses porphyrines des coquilles de Trochidés possèdent le spectre d'absorption des uroporphyrines. L'existence de porphyrines dans les coquilles de Mollusques semble être limitée à quelques espèces appartenant à des familles déterminées. Ainsi, alors que les coquilles des Ptéridés (genre *Pteria*) renferment généralement des porphyrines, celles des familles voisines des Vulsellidés (genre *Perna*) et des Pinnidés (genre *Pinna*), dont nous avons examiné quelques exemplaires (*Perna patibulum*, *Pinna nobilis*), en sont dépourvues.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons exposé nos recherches sur le mode d'obtention et sur les propriétés des esters méthyliques de la biliverdine IX α et de la biliverdine des coquilles d'œufs d'Emeu. Nous avons ensuite étudié le pigment bleu du squelette calcaire d'un Octocoralliaire : *Heliopora cærulea* ou corail bleu, et nous avons comparé les propriétés de ce pigment avec celles de la biliverdine IX α .

Dans la préparation de l'ester méthylique de la biliverdine IX α , nous avons appliqué la méthode chromatographique à la purification de ce pigment, dont nous avons ainsi simplifié le mode d'obtention. L'ester méthylique de la biliverdine cristallise en prismes bleu foncé de point de fusion 217° - 218° . Nous en avons plus particulièrement étudié les spectres d'absorption dans l'ultra-violet et le visible. La courbe d'absorption dans l'ultra-violet de l'ester méthylique de la biliverdine diffère de celles des esters méthyliques de la glaucobiline et de la ptérobiline, permettant ainsi une distinction de ces trois pigments.

Appliquant la méthode chromatographique à la purification de la biliverdine des coquilles d'œufs d'Emeu, nous avons pu isoler ce pigment sous forme d'ester méthylique

de point de fusion 217°-218°. Le mélange de ce pigment et de l'ester méthylique de la biliverdine IX α ne montre aucun abaissement du point de fusion. La forme cristalline, la teneur en azote et les solubilités de ces deux pigments, ainsi que leur comportement chromatographique et leurs spectres d'absorption dans l'ultra-violet et le visible, sont analogues. La biliverdine des coquilles d'œufs d'Emeu est donc identique à la biliverdine IX α . La purification des pigments des coquilles d'œufs d'Oiseaux est facilitée par la substitution de la méthode chromatographique aux procédés chimiques ordinaires. Cette méthode nous a permis, en outre, de mettre en évidence un pigment jaune se transformant par oxydation en biliverdine; ce pigment est, selon toute vraisemblance, de la bilirubine.

En dernier lieu, nous avons indiqué les recherches effectuées sur le pigment bleu du squelette calcaire d'*Heliopora cærulea*. Après destruction du substrat calcaire par l'acide chlorhydrique dilué, demeure un résidu pigmenté d'où la matière colorante bleue est extraite par une solution légèrement alcaline. Nous avons désigné le pigment bleu, précipité de cette solution alcaline par acidification, sous le terme de « pigment brut », et nous en avons étudié les propriétés. Cette matière colorante possède les principales réactions des pigments biliaires, mais se montre insoluble dans les solvants organiques. Par contre, en attaquant le squelette calcaire d'*Heliopora* par de l'alcool méthylique chlorhydrique, nous avons obtenu le pigment bleu sous forme d'ester méthylique possédant les solubilités et les réactions des esters méthyliques des bilirubinoïdes. Les propriétés de ce pigment ont été comparées avec celles de l'ester méthylique de la biliverdine IX α . Les produits d'oxydation de l'ester méthylique du pigment bleu d'*Heliopora* sont comparables par leurs réactions et leurs spectres d'absorption à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec l'ester méthylique de la biliverdine (bilipurpurines, cholétéline). De même les produits de réduction présentent les réactions du mésobilirubinogène et de l'urobiline.

Le pigment d'*Heliopora* n'a pu cependant être isolé à l'état cristallisé, des essais de purification par chromatographie sur alumine n'ayant donné aucun résultat satisfaisant. Ainsi, bien que présentant de grandes analogies avec l'ester méthylique de la biliverdine, le pigment bleu d'*Heliopora* diffère de ce bilirubinoïde par son comportement chromatographique. Aussi, le pigment bleu du squelette calcaire d'*Heliopora cærulea* ne pouvant être assimilé à aucun bilirubinoïde actuellement connu, nous proposons de lui donner le nom d'*hélioporobiline*, afin de rappeler sa parenté avec les pigments biliaires.

BIBLIOGRAPHIE

- (75) BOURNE (G. C.). — On the structure and affinities of *Heliopora cærulea* PALLAS, with some observations on the structure of *Xenia*, *Heteroxenia*. *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, 186, 1895, p. 455.
- (56) DHÉRÉ (CH.) et BAUMELER (C.). — Sur la rufine, pigment tégumentaire de l'*Arion rufus*. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 99, 1928, 2, p. 492.
- (51) (87) DHÉRÉ (CH.) et BAUMELER (C.) — Recherches sur la « rufescine », pigment de la coquille de l'*Haliotis rufescens*. *Arch. int. Physiol.*, 32, 1930, p. 55.
- (57) DHÉRÉ (CH.), BAUMELER (C.) et SCHNEIDER (A.). — Spectrochimie de la rufine et de ses dérivés. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 99, 1928, 2, p. 722.
- (25) DHÉRÉ (CH.) et FONTAINE (M.). — Recherches sur la fluorescence des Algues et de leurs constituants pigmentaires. *Ann. Inst. Océan.*, t. X, fasc. IX, 1931.

- (48) (69) DINELLI (D.). — Sulle sostanze coloranti del guscio delle uova di casuario. *Atti. della Reale Accademia Nazionale dei Lincei*, 22, 1935, p. 464.
- (55) DOR (L.). — Urobiline des Gastéropodes. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 54, 1902, p. 54.
- (3) (16) FISCHER (H.). — Ueber das Urinporphyrin. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 95, 1915, p. 34.
- (58) FISCHER (H.), BAUMGARTNER (H.) et HESS (R.). — Ueber Ferro- und Glaukobilin. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 206, 1932, p. 201.
- (2) FISCHER (H.) et HAARER (E.). — Ueber Uroporphyrin aus Muschelschalen. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 204, 1932, p. 101.
- (4) FISCHER (H.) et HEISEL (P.). — Synthese des Iso-uroporphyrins und der carboxylierten Hämatinsäure. *Ann. der Chem.*, 457, 1927, p. 83.
- (10) (13) FISCHER (H.) et HOFMANN (H. J.). — Ueber die Konstitution des Uro- und Muschelschalen-porphyrins. Nachweis von Uroporphyrin III bei kongenitaler Porphyrrie. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 246, 1937, p. 15.
- (6) FISCHER (H.) et HOLT (E. von). — Synthese des Iso-Konchoporphyrins I sowie des Deuteroporphyrins II. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 227, 1934, p. 124.
- (7) FISCHER (H.) et HOLT (E. von). — Synthese des 1, 4, 5, 8-Tetramethyl-2, 3, 6, 7-tetraabernsteinsäureporphyrins und über Iso-uroporphyrin I. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 229, 1934, p. 93.
- (1) (15) (17) FISCHER (H.) et JORDAN (K.). — Ueber Konchoporphyrin, sowie Ueberführung von Protoporphylin aus Malz in Mesoporphylin IX. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 190, 1930, p. 75.
- (41) FISCHER (H.) et KOGL (F.). — Zur Kenntnis der natürlichen Porphyrine. IV Ueber das Ooporphyrin. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 131, 1923, p. 241.
- (9) FISCHER (H.) et LIBOWITZKY (H.). — Auftreten von Uro-bzw-Koproporphyrin I bei akuter Porphyrrie. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 241, 1936, p. 220.
- (29) FISCHER (H.) et NIEMANN (G.). — Zur Kenntnis des Gallenfarbstoffs. VIII Mitt. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 137, 1924, p. 293.
- (62) FISCHER (H.) et PLIENINGER (H.). — Synthese des Biliverdins (Uteroverdins) und Bilirubins, der Biliverdine XIII und III, sowie der Vinylneoxanthosäure. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 274, 1942, p. 231.
- (61) (63) FISCHER (H.) et REINECKE (H.). — Ueber Methoxy-glaukobiline, einen neuen Typ bilirubinoider Farbstoffe, gleichzeitig ein Beitrag zur Kenntnis der Gmelinschen Reaktion. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 265, 1940, p. 9.
- (5) FISCHER (H.) et SIEBERT (R.). — Synthese des Iso-uroporphyrins I. *Ann. der Chem.*, 483, 1930, p. 1.
- (8) (19) FISCHER (H.) et ZISCHLER (H.). — Synthese der 1, 3, 5, 7-Tetramethylporphyrin-2, 4, 6, 8-tetraabernsteinsäure. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 245, 1937, p. 123.
- (37) FONTAINE (M.). — Recherches sur quelques pigments sériques et dermiques de Poissons marins (Labridés et Cycloptéridés). *Bull. Inst. Océan.*, 38, 1941, n° 792.
- (30) FONTAINE (M.) et RAFFY (A.). — Sur la nature chimique de l'aplysiopurpurine. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, t. LXI, n° 2, 1936, p. 49.
- (83) GRAMS (E.), in WIELAND (H.) et TARTTER (A.). — *Ann. der Chem.*, 545, 1940, p. 197.
- (18) HAUSMANN (W.) et KRUMPEL (O.). — Ueber die Absorption der Porphyrine im Ultraviolett. *Biochem. Zeitschr.*, 186, 1927, p. 203.
- (52) KODZUKA (T.). — Ueber den Farbstoff des Seeohrs. *The Tohoku Journ. of Experimental Medicine*, 2, 1921, p. 287.
- (49) KRÜKENBERG (C. Fr.). — Zur Kenntnis der Genese der Gallenfarbstoffe und der Melanine. I Mitt. *Centralbl. d. med. Wissensch.*, 44, 1883, p. 785.
- (60) KUSTER (W.). — Beiträge zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe. Ueber Bilirubin, Biliverdin und ihre Spaltungsprodukte. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 59, 1909, p. 63.
- (31) LEDERER (E.) et HUTTRER (C.). — Quelques observations sur les pigments de la sécrétion des Aplysies (*Aplysia punctata*). *Trav. des membres de la Soc. chim. biol.*, t. XXIV, n° 1, 1942, p. 1055.
- (21) (36) LEMBERG (R.). — Die Chromoproteide der Rotalgen. I Mitt. *Ann. der Chem.*, 461, 1928, p. 46.

- (22) (26) (81) LEMBERG (R.). — Die Chromoproteide der Rotalgen. II Mitt. *Ann. der Chem.*, 477, 1930, p. 195.
- (45) (71) (84) LEMBERG (R.). — Ueber Oocyan. *Ann. der Chem.*, 488, 1931, p. 74.
- (54) (82) LEMBERG (R.). — Ueber die Pigmente von *Haliotis californiensis*. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 200, 1931, p. 173.
- (46) (72) LEMBERG (R.). — Ueber Dehydrobilirubin. *Ann. der Chem.*, 499, 1932, p. 25.
- (23) (27) LEMBERG (R.). — Die Phycobilin der Rotalgen, Ueberführung in Mesobilirubin und Dehydromesobilirubin. *Ann. der Chem.*, 505, 1933, p. 151.
- (47) (68) LEMBERG (R.). — Bile Pigments. VII Biliverdin, Uteroverdin and Oocyan. *The biochemical Journal*, 28, 1934, p. 978.
- (42) LIEBERMANN (C.). — Ueber die Färbungen der Vogeleienschalen. *Ber. deutsch. Chem. Ges.*, 11, 1878, p. 606.
- (39) LINDEN (G. von). — Morphologische und physiologisch-chemische Untersuchungen über die Pigmente der Lepidopteren. I Mitt. *Arch. physiol.*, 98, 1, 1903.
- (76) LIVERSIDGE. — The blue colouring matter : the blue pigment in coral (*Heliopora cærulea*) and other animal organisms. *Chem. News*, 80, 1899, p. 29, p. 41.
- (20) MERTENS (E.). — Ueber die bei akuter Porphyrie auftretenden Porphyrine. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 250, 1937, p. 57.
- (74) MOSELEY (H. N.). — On the structure and relations of the Alcyonarian *Heliopora cærulea* with some account on the anatomy of a species of *Sarcophyton*. *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, 160, 1875, p. 91.
- (64) PRUDHOMME (R. O.). — Spectres d'absorption dans l'ultra-violet du sérum normal humain et du sérum paludéen. *Ann. Inst. Pasteur*, 67, 1941, p. 419.
- (77) RANSON (G.) et DURIVALT (A.). — Le pigment d'*Heliopora cærulea* PALL. et de quelques autres Alcyonaires. *C. R. Soc. Biol.*, 126, 1937, p. 1149.
- (24) ROCHE (J.). — Pigments des algues rouges. *Arch. Phys. et Biol.*, t. X, 1933.
- (32) SCHREIBER (G.). — Ricerche sui pigmenti delle Aplisie. *Publ. Staz. Zool. Napoli*, 12, 1932, p. 292.
- (50) SCHULZ (F. N.). — Ueber das Vorkommen von Gallenfarbstoffen im Gehäuse von Mollusken. *Zeitschr. f. allg. Physiol.*, 3, 1904, p. 91.
- (53) SCHULZ (F. N.) et BECKER (M.). — Haliotis-indigo, der blaue Gehäusefarbstoff von *Haliotis californiensis*. *Biochem. Zeitschr.*, 236, 1931, p. 99.
- (28) (33) (59) SIEDEL (W.). — Synthese des Glaukobilins sowie über Urobilin und Mesobiliviolin. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 237, 1935, p. 8.
- (85) SIEDEL (W.) et FROWIS (W.). — Ueber die Violetstufe der Gmelinschen Reaktion (Mesobilipurpurine). I Mitt. Ueber den Mechanismus des Gmelinschen Reaktion. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 267, 1940, p. 37.
- (86) SIEDEL (W.) et GRAMS (E.). — Ueber Bildung und Konstitution der Mesobilipurpurin und Mesocholetelin sowie über eine neue Ausführung der Gmelin Reaktion. II Mitt. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 267, 1940, p. 49.
- (34) SIEDEL (W.) et MÖLLER (H.). — Ueber Mesobiliviolin. I Mitt. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 264, 1940, p. 64.
- (73) SILLIMAN, in DANA. — Structure and classification of Zoophytes. Philadelphie, 1846.
- (44) SORBY (H. C.). — On the Colouring-matters of the Shells of Bird's Eggs. *Proc. Zool. Soc. London*, 1875, p. 351.
- (65) STERN (A.) et PRUCKNER (F.). — Ueber die Absorptionsspektren der Pyrrolfarbstoffe. II Mitt. *Zeitschr. f. physik. Chemie (A.)*, 182, 1938, p. 117.
- (14) STERN (A.) et WENDERLEIN (H.). — Lichtabsorption der Porphyrine. IV Mitt. *Zeitschr. f. physik. Chemie*, 175, 1936, p. 405.
- (78) TIXIER-DURIVALT (A.). — Contribution à l'étude du métabolisme du calcium et du fer chez l'*Alcyonium palmatum* PALL. *Ann. Inst. Océan.*, t. XX, fasc. 5, 1940.
- (79) TIXIER (R.) et TIXIER-DURIVALT (A.). — Le pigment du Polypier d'un Octocoralliaire: *Heliopora cærulea* (PALL.). I. Pigment « brut ». *Bull. Soc. Chim. biol.*, 24, 1942, p. 376.
- (80) TIXIER (R.) et TIXIER-DURIVALT (A.). — Le pigment du Polypier d'un Octocoralliaire: *Heliopora cærulea* (PALL.). II. Ester méthylique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 25, 1943, p. 98.

- (11) WALDENSTRÖM (J.). — Observations on acute porphyria and other conditions with a change in the excretions of porphyrins. *Acta. med. scand.*, 83, 1934, p. 281.
- (12) WALDENSTRÖM (J.), FINK (H.) et HOEBURGER (W.). — Ueber ein neues bei der akuten Porphyrie regelmässig vorkommendes Uroporphyrin. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 233, 1935, p. 1.
- (43) WICKE (W.). — Ueber das Pigment in den Eischalen der Vögel. *Naumania*, 1858, p. 393.
- (40) (66) (67) WIELAND (H.) et TARTTER (A.). — Ueber die Flügelpigmente der Schmetterlinge. VIII Pterobilin, der blaue Farbstoff der Pieridenflügel. *Ann. der Chem.*, 545, 1940, p. 197.
- (38) WILLSTÆDT (H.). — Zur Kenntnis der grünen Farbstoffe von Seefischen. *Enzymologia*, 9, 1941, p. 260.
- (70) ZECHMEISTER (L.) et CHOLNOKY (L. VON). — Die Chromatographische adsorptions-methode. Vienne, 1937.
- (35) ZEYNECK (R. VON). — Ueber den blauen Farbstoff aus den Flossen des *Crenilabrus pavo*. *Monat. f. Chem.*, 34, 1913, p. 535.

